

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Ústav pro životní prostředí



Biodegradace vybraných psychofarmak v podzemní vodě pomocí houby

Pleurotus ostreatus

Biodegradation of selected psychopharmaceuticals in underground water

using *Pleurotus ostreatus*

Diplomová práce

Bc. Lucie Krejčová

Vedoucí práce: doc. RNDr. Tomáš Cajthaml, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Zdena Křesinová, Ph.D.

Praha 2015

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením doc. RNDr. Tomáše Cajthamla, Ph.D. a konzultantky RNDr. Zdeny Křesinové, Ph.D. a že jsem všechny použité prameny řádně citovala. Dále prohlašuji, že předložená tištěná verze diplomové práce je totožná s elektronickou verzí vloženou do SIS.

V Praze dne 15. 8. 2015

.....
Bc. Lucie Krejčová

Poděkování:

Děkuji školiteli RNDr. Tomášovi Cajthamlovi, PhD. za odborné vedení diplomové práce. Děkuji RNDr. Zdeně Křesinové, Ph.D. za konzultace, rady a pomoc při sestavování experimentů. Dále děkuji Ing. Aleně Filipové a RNDr. Martinovi Ezechiášovi za pomoc při toxikologických testech. Děkuji také své rodině a přátelům za podporu při studiu a při psaní této diplomové práce.

ABSTRAKT

Degradační účinnost ligninolytické houby *Pleurotus ostreatus* byla zkoumána pro 4 farmaka a 5 látek používaných nebo vznikajících při výrobě farmak, které byly detekovány v podzemní vodě v blízkosti jejich výroby. Zjištěné maximální koncentrace sledovaných látek se v podzemních vodách pohybovaly od 0,23 µg/l do 227,87 µg/l, kromě jedné látky, která nebyla detekována v žádném vzorku. Degradační účinnost houby *P. ostreatus* byla sledována v degračních pokusech s jednotlivými látkami i směsí všech 9-ti látek. V degračních pokusech s jednotlivými látkami byl *P. ostreatus* schopný snížit koncentraci 5-ti látek o 62 až 100 % z původní koncentrace 10 mg/l po 14-ti dnech kultivace na maltextrakt-glukózovém médiu. Při degradaci směsi látek byl zjištěn úbytek koncentrace 5-ti látek z 9-ti o 52 až 100 % z původní koncentrace (2 mg/l každé látky) po 14-ti dnech kultivace na maltextrakt-glukózovém médiu. Testy akutní toxicity s *Vibrio fischeri* v průběhu degradace naznačují tvorbu metabolitů, které jsou více toxické než původní látky. Hodnota EC₅₀ se při testech akutní toxicity s *Vibrio fischeri* jednotlivých látek pohybovala v rozmezí od 5,45 mg/l do 131,98 mg/l.

Klíčová slova: biodegradace, farmaka, ligninolytické houby, *Pleurotus ostreatus*, podzemní voda, toxicita, *Vibrio fischeri*

ABSTRACT

The ability of the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus* to degrade 4 pharmaceutical drugs and 5 compounds which are either used during drug manufacturing or are created as by-products was studied. These compounds were detected in groundwater near a drug manufacturing plant. The maximum concentration levels of the selected compounds in tested groundwater samples varied from 0.23 µg/l to 227.87 µg/l apart from 1 compound which was not detected in any sample. The degradation efficiency of *P. ostreatus* was examined with individual compounds as well as with the mixture of all 9 compounds. When degrading individual compounds *P. ostreatus* lowered the initial concentration (10 mg/l) of 5 compounds by 62–100% after 14-day cultivation in malt extract-glucose medium. When degrading the compound mixture *P. ostreatus* lowered the initial concentration (2 mg/l of each compound) of 5 compounds by 50–100% after 14-day cultivation in malt extract-glucose medium. Acute toxicity tests with *Vibrio fischeri* suggest the formation of metabolites which are more toxic than the original compounds. The EC₅₀ value for individual compounds during toxicity tests with *Vibrio fischeri* was 5.45–131.98 mg/l.

Keywords: biodegradation, pharmaceuticals, ligninolytic fungi, *Pleurotus ostreatus*, groundwater, toxicity, *Vibrio fischeri*

Obsah

SEZNAM ZKRATEK.....	7
1. ÚVOD.....	8
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	9
2.1. Farmaka v životním prostředí.....	9
2.1.1. Výskyt farmak v životním prostředí.....	10
2.1.2. Zdroje farmak.....	10
2.1.3. Rizika spojená s výskytem farmak v životním prostředí.....	11
2.2. Odstranění farmak z životního prostředí.....	14
2.2.1. Abiotická degradace farmak.....	14
2.2.2. Biologická degradace farmak.....	15
2.3. Ligninolytické houby	18
2.3.1. Enzymový aparát ligninolytických hub	18
2.3.2. Degradace farmak ligninolytickými houbami.....	20
2.4. Sledovaná farmaka	22
2.4.1. Přítomnost sledovaných látek v podzemní vodě	25
4. CÍLE PRÁCE.....	26
4. MATERIÁL A METODY	27
4.1. Použitý materiál a přístroje.....	28
4.1.1. Standardy sledovaných látek.....	28
4.1.2. Ostatní chemikálie	28
4.1.3. Použité přístroje.....	29
4.2. Stanovení látek ve vzorcích podzemní vody.....	29
4.2.1. Vývoj metodiky extrakce na pevnou fázi	30
4.2.2. Extrakce vzorků podzemní vody na pevnou fázi	30
4.3. Degradální pokusy	31
4.3.1. Příprava houbové kultury pro degradační pokusy.....	31
4.3.2. Příprava vzorků k měření.....	32
4.3.3. Stanovení enzymatických aktivit a množství proteinů	33
4.4. Použité chromatografické metody.....	35
4.4.1. Chromatografické podmínky HPLC-UV	35
4.4.2. Chromatografické podmínky LC/MS	35

4.5. Testy toxicity	37
4.5.1. Princip testu toxicity s <i>Vibrio fischeri</i>	37
4.5.2. Příprava bakterií	37
4.5.3. Měření akutní toxicity jednotlivých látek a směsí látek	38
4.5.4. Měření akutní toxicity degradačních pokusů	39
5. VÝSLEDKY A DISKUZE	40
5.1. Stanovení farmak na LC/MS	40
5.2. Analýza podzemních vod	41
5.2.1. Vývoj metodiky extrakce na C-18 disky	41
5.2.2. Koncentrace sledovaných látek ve vzorcích podzemní vody	41
5.3. Akutní testy toxicity s <i>Vibrio fischeri</i>	43
5.4. Biodegradace farmak houbou <i>Pleurotus ostreatus</i>	45
5.4.1. Výsledky degradace sledovaných látek	45
5.4.2. Enzymová aktivita ligninolytických enzymů v průběhu degradace	48
5.4.3. Toxicita tekutého média v průběhu degradace	50
6. ZÁVĚR	52
LITERATURA	53
PŘÍLOHY	62

SEZNAM ZKRATEK

ABTS	diamonná sůl kyseliny 2,2'-azino-bis(3-ethyl-benzothiazolin-6-sulfonové)
ACN	acetonitril
AMI	amitriptylin
BUT	butamirát
CLT	2-chlorothioxanthon
CPX	chlorprothixen
ČOV	čistírna odpadních vod
DMP	2,6-dimethoxyfenol
DMSO	dimethylsulfoxid
DSL	dosulepin
EtAC	ethylester kyseliny octové
HPLC-UV	vysokoúčinný kapalinový chromatograf se spektrofotometrickou detekcí v ultrafialové oblasti spektra
ISP	2- isopropenylbenzofenon
KRD	karbinol dosulepin
KRM	karbinol melitracen
Lac	lakáza
LiP	lignin peroxidáza
LOQ	mez kvantifikace
MEG	maltextrakt-glukozové médium
MeOH	metanol
MnP	mangan dependentní peroxidáza
PAU	polycyklické aromatické uhlovodíky
PCB	polychlorované bifenily
THP	thiepinon
VP	versatilní peroxidáza

1. ÚVOD

Farmaka jsou ve velkém množství používána jak v humánní, tak i veterinární medicíně a díky jejich širokému užívání se dostávají do životního prostředí. Farmaka byla vyvinuta s cílem vyvolat biologický účinek a to z nich činí potenciálně nebezpečné látky i pro necílové organismy. Přítomnost farmak byla potvrzena nejen v půdě a podzemních a povrchových vodách, ale také ve vodě pitné (Kümmerer, 2009). Jedním z možných řešení odstranění těchto látek jsou čistírny odpadních vod, ty však nejsou schopné většinu farmak z vody zcela odstranit (Kasprzyk-Horderna kol., 2009). Je tedy nutné najít jiný způsob odstranění těchto polutantů ze životního prostředí, a to nejen při procesu čištění vody v čistírnách odpadních vod, ale také z dalších míst kontaminace.

Možným řešením mohou být ligninolytické houby, které jsou díky svým unikátním enzymům schopné rozkládat lignin a jiné aromatické látky. Degradční schopnosti ligninolytických hub byly již prokázány pro řadu těžce rozložitelných organických látek, jako jsou např. polychlorované bifenyle (PCB), polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU), endokrinní disruptory, syntetická barviva a některé pesticidy (Pointing, 2001). Vysoký degradační účinek ligninolytických hub byl také zjištěn u některých zástupců farmak (Rodríguez-Rodríguez a kol., 2012).

V této diplomové práci byla zkoumána schopnost ligninolytické houby *Pleurotus ostreatus* (hlívy ústříčné) degradovat 4 farmaka a 5 látek používaných nebo vznikajících při výrobě farmak. Tyto látky byly nalezeny v podzemní vodě v blízkosti výroby farmak ve vysokých koncentracích, proto by měly být z dané lokality odstraněny.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Farmaka v životním prostředí

Farmaka jsou látky sloužící k předcházení, léčení, nebo zmírnění projevů chorob (Lüllmann a kol., 2004). Farmaka jsou ve velkém množství používána jak v humánní tak i veterinární medicíně a díky jejich širokému užívání se dostávají do životního prostředí. Chemická struktura většiny farmak zapříčiňuje jejich vysokou rozpustnost ve vodě a také nízkou rozložitelnost, proto se mohou snadno šířit a přetrvávat v životním prostředí. Odhad chování farmak v životním prostředí je díky jejich rozmanité struktuře komplikovaný a může se lišit i v rámci stejné terapeutické skupiny (Heberer, 2002).

Tab 1: Přehled hlavních terapeutických skupin farmak vyskytujících se v životním prostředí

Terapeutická třída	Bližší specifikace	Hlavní zástupci
Analgetika a antiflogistika	Léky proti bolesti a protizánětlivé léky	paracetamol, ibuprofen, diklofenak, kyselina salicylová, ketorprofen, naproxen, kodein
Antibiotika	Látky usmrcující některé mikroorganismy, nebo bránící jejich růstu	erytromycin, oflatoxin, ciproloxacin, trimetoprim, sulfamethaxazol
Antidepresiva a anxiolytika	Léky potlačující deprese a úzkost	fluvoxamin, fluoxetin, sertralin, paroxetin, citalopram, amitriptylin
Antiepileptika	Léky potlačující projevy epilepsie	karbamazepin, diazepam, gabapentin
Antihistaminika	Léky blokující vznik a účinky histaminu, který způsobuje vznik edémů	diphenhydramine, promethazin
Beta-blokátory	Léky působící na kardiovaskulární systém, např. léky snižující vysoký tlak	propranolol, metoprolol, atenolol
Homony	Hormonální léčiva, antikoncepce	17 α -ethynylestradiol, estron
Hypolipidemika	Látky snižující koncentraci lipidů v krvi, včetně cholesterolu	gemfibrozil, klofibrát, bezafibrát, fluvastatin

(Kasprzyk-Hordern a kol., 2009; Santos, 2013)

2.1.1. Výskyt farmak v životním prostředí

Přítomnost farmak byla řadou studií potvrzena v odpadních a povrchových vodách. Nejvyšší koncentrace v povrchových vodách jsou sledovány u některých zástupců analgetik a nesteroidních antiflogistik, antibiotik a antiepileptik, jejichž koncentrace dosahují ve sledovaných vodách až jednotek $\mu\text{g/l}$. Na přítocích a odtocích odpadních vod se koncentrace některých zástupců farmak těchto terapeutických skupin mohou pohybovat v řádu desítek až stovek $\mu\text{g/l}$. Dalšími skupinami léčiv, které jsou často detekovány v povrchových vodách, jsou beta-blokátory, hypolipidemika, antidepresiva a antikoncepční přípravky. U těchto terapeutických skupin jsou maximální zjištěné koncentrace v povrchových vodách v řádu jednotek až stovek ng/l (Ternes, 1998; Zhou a kol., 2009; Kasprzyk-Horderna kol., 2009; Baker a Kasprzyk-Hordern, 2013; Periea kol. 2015).

Přítomnost farmak byla v některých lokalitách zjištěna také v podzemních vodách, většinou se jednalo o některé zástupce analgetik, antiepileptik a antibiotik v maximálních koncentracích v řádu jednotek $\mu\text{g/l}$ (Sacher a kol., 2001; López-Serna a kol., 2013). Farmaka byla dokonce nalezena v pitné vodě zásobující některá evropská města v maximálních koncentracích desítek ng/l (Togola a Budzinski, 2008; Houtman a kol., 2014; De Jesus Gaffney a kol., 2015).

Farmaka jsou kromě vodního prostředí přítomna také v některých zemědělsky využívaných půdách, které jsou využívány k chovu, nebo na které je aplikován hnůj, či farmaky kontaminovaná voda. Koncentrace zjištěné v těchto půdách se pohybují v řádu jednotek až desítek $\mu\text{g/kg}$ a jedná se převážně o antibiotika (Kemper, 2008; Li, 2014).

2.1.2. Zdroje farmak

Farmaka a jejich metabolity nejčastěji vstupují do životního prostředí vylučováním, nebo jejich odstraňováním do odpadních vod. Vzhledem k tomu, že čistírny odpadních vod (ČOV) nejsou schopné zcela odstranit tyto látky (Zhou a kol., 2009), jsou komunální a nemocniční odpadní vody nejdůležitějším zdrojem farmak v životním prostředí. Koncentrace některých farmak přítomných ve sledovaných odpadních vodách překročila hodnotu $100\mu\text{g/l}$ (Kasprzyk-Horderna kol., 2009; Santos a kol., 2013).

Lidé se často zbavují nepotřebných a prošlých léků jejich vyhozením do komunálního odpadu, který je následně spálen, nebo uložen na skládkách. Farmaka se na skládkách společně s dalšími nečistotami dostávají do vodního výluhu, který pokud není

dostatečně zachycován, může kontaminovat okolní půdu a povrchové a podzemní vody (Peng a kol., 2014).

Chovy zvířat mohou být zdrojem některých druhů farmak, jimiž jsou zejména antibiotika. Farmaka vylučována zvířaty končí v půdách prostřednictvím pastvy nebo hnoje používaného pro zemědělské účely. Následně mohou být vylouhována do vody, nebo se vázat na organickou hmotu v půdě a přetrvávat tak v půdním prostředí (Kemper, 2008).

Velmi významným zdrojem znečištění mohou být také výroby farmak. V odpadních vodách z těchto výroben byly u některých farmak zjištěny koncentrace až 100 krát vyšší než v odpadních vodách z nemocnic a komunálních odpadních vodách (Larssona kol., 2007; Lina kol., 2008). To se může projevit na znečištění vod v okolí těchto výroben, jak ukazuje studie Fick a kol. (2009), ve které byly v podzemních a povrchových vodách u výroby sledovány antibiotika, které dosahovaly koncentrací v řádech jednotek až desítek mg/l, což je 100 000 až 1 milion krát více, než koncentrace vyskytující se v povrchových vodách.

2.1.3. Rizika spojená s výskytem farmak v životním prostředí

Farmaka byla vyvinuta s cílem vyvolat biologický účinek, a to z nich činí potenciálně nebezpečné látky i pro necílové organismy. Některá farmaka jsou schopná projít biologickými membránami a zaměřit se na specifické buňky a tkáně. Tato specifická účinnost může negativně ovlivnit ty organismy, které mají podobné biologické systémy a fyziologické procesy jako cílové organismy. Mnoho podobných biologických systémů se vyskytuje u všech obratlovců, proto lze předpokládat, že tato skupina organismů bude nejvíce citlivá expozici farmakům (Huerta a kol., 2012).

Negativní působení farmak na organismy je možné hodnotit na základě akutních a chronických testů toxicity. U akutních testů toxicity je u organismů sledována zejména 50% úmrtnost (LC_{50}), nebo 50% inhibice (EC_{50}). V chronických testech toxicity se často také sleduje koncentrace, která ještě nevyvolává žádný účinek (NOEC) a nejnižší koncentrace, u které lze již účinky na daném organismu pozorovat (LOEC).

Velké množství studií při hodnocení vlivu farmak na organismy používalo standardní testy akutní toxicity a bylo zaměřeno především na léčiva, která se často vyskytují v životním prostředí. U většiny testovaných farmak se hodnoty LC_{50} a EC_{50}

pohybovaly v řádu jednotek až stovek mg/l (Halling-Sorensena kol., 1998; Ferrari a kol., 2003; Henry a kol., 2004; Hernando a kol., 2004). Výjimkou jsou některé skupiny antibiotik a antiparazitik, které mohou být akutně toxické již od jednotek µg/l (Halling-Sorensena kol., 1998; Backhaus a Grimme, 1999). Zjištěné koncentrace farmak v akutních testech toxicity jsou mnohonásobně vyšší, než koncentrace zjištěné v povrchových vodách. Vodní organismy mohou být farmakům vystaveny dlouhodobě (mnohdy i po celý svůj život), proto mají větší vypovídající hodnotu chronické testy toxicity. Jak ukazují některé studie hodnoty LOEC v chronických testech toxicity mohou být 10 až 1000 krát nižší, než hodnoty LC₅₀ či EC₅₀ v akutních testech toxicity (Halling-Sorensena kol., 1998; Ferrari a kol., 2003; Henry a kol., 2004).

Vodní organismy však mohou být farmakům vystaveny dlouhodobě (mnohdy i po celý svůj život), proto mají větší vypovídající hodnotu chronické testy toxicity

V rámci provedených testů toxicity byly pozorovány různé účinky farmak na organismy. Pokles aktivity a změny v chování u *Gammarus pulex* byly zjištěny po expozici jednoho z nejpoužívanějších nesteroidních antiflogistik ibuprofenu a antidepressiva fluoxetinu v koncentracích již od 10 ng/l (De Lange a kol., 2006). Snížení počtu a životaschopnosti vajec u *Oryzias latipes* bylo sledováno po šestitýdenní expozici 0,5 µg/l nejpoužívanějšího zástupce beta-blokátorů propranololu (Hudggett a kol., 2002). Cytopatologické změny na ledvinách, játrech a žábrách u *Oncorhynchus mykiss* a *Cyprinus carpio* byly pozorovány po expozici nesteroidního antiflogistika diklofenaku, antiepileptika karbamazepinu a beta-blokátoru metoprololu od koncentrace 1 µg/l (Triebskorn a kol., 2007). Jedním ze sledovaných účinků farmak na organismy je endokrinní disrupce, která se projevuje např. změnami v pohlavních orgánech, předčasným či zpožděným vyspíváním jedinců, neplodností, změnami v reprodukčních cyklech, atd. Endokrinní disrupce hormonálních léčiv a antikoncepčních přípravků byla prokázána u celé řady organismů. Například 17α-enthynylestradiol je schopný vyvolat endokrinní disrupci již v koncentraci 0,1 ng/l u některých ryb a bezobratlých organismů (Crane a kol., 2006; Farré a kol., 2008). Kromě hormonálních léčiv byla endokrinní disrupce pozorována u některých antidepressiv již od koncentrací 10 ng/l (Fong, 1998; Yanga kol., 2014) a také u dvou zástupců hypolipidemik gemfibrozilu a kyseliny klofibrové (Mimeault a kol., 2005; Runnalls a kol., 2007).

Jednotlivá farmaka se vyskytují v životním prostředí ve směsi s dalšími léčivy a jejich metabolity, což může umocňovat jejich vliv na organismy. Cleuvers (2008) zjistil, že toxicita směsi nesteroidních protizánětlivých látek zkoumaná na *Daphnia magna* byla

značně vyšší v koncentracích, u kterých jednotlivé látky nevykazovaly žádné účinky. Flaherty a Dodson (2005) zkoumali účinky směsi 36 µg/l fluoxetinu a 100 µg/l kyseliny klofibrové v akutním testu toxicity na *Daphnia magna*. Přestože u jednotlivých látek v těchto koncentracích nebyly zjištěny toxické účinky, ve společné směsi byla sledována podstatná úmrtnost a malformace *Daphnia magna*. Toxický vliv směsi farmak na necílové organismy tedy může být vyšší, než jaký byl odhadnut v toxikologických testech u jednotlivých látek, zvláště jedná-li se o látky se stejným či podobným mechanismem účinku.

Jak již bylo zmíněno, někteří zástupci antibiotik mohou vykazovat při krátkodobé expozici toxické účinky již v nízkých koncentracích (Backhaus a Grimme, 1999). Antibiotika mohou být nebezpečná nejen svojí toxicitou pro necílové organismy, ale také možným působením na bakterie, které vůči nim postupně získávají rezistenci. V případě jejich využití v medicíně pak mohou být tato antibiotika nefunkční (Crane a kol., 2006).

U některých farmak byla zjištěna také schopnost bioakumulace, která může nejen zvyšovat jejich toxické účinky, ale také expozici daným léčivům v potravním řetězci. Obecně platí, že látky, které mají rozdělovací koeficient oktanol/voda ($\log K_{ow}$) vyšší, nebo roven 3, mají potenciál se akumulovat v organismech (Huerta a kol., 2012). Schopnost akumulace farmak v rybách a bezobratlých organismech, které byly vystaveny farmakům v řekách přijímajících odpadní vody z ČOV, byla potvrzena u několika zástupců ze skupiny antidepresiv, antiepileptik, antihistaminik, antibiotik, beta-blokátorů a hormonů. Farmaka se ve sledovaných organismech vyskytovala v maximálních koncentracích v řádu jednotek ng/g, ve výjimečných případech v desítkách ng/g (Huerta a kol., 2012). Nejvyšší koncentrace farmak byly u ryb zjištěny v játrech, ledvinách a mozku, nejnižší ve svalovině (Brooks a kol., 2005). Bioakumulaci na úrovni trofického řetězce prokázal po expozici karbamazepinu Vernouillet a kol. (2010). V průběhu experimentu byla sledována akumulace v řase *Pseudokirchneriella subcapitata* a následně také v korýši *Thamnocephalus platyurus*, který se danou řasou živil. Schopnost akumulace nesteroidního antiflogistika diklofenaku v ledvinách nejspíš způsobila snížení populace tří druhů supů v Asii. Potravinou supů byla diklofenakem ošetřená hospodářská zvířata a díky tomu docházelo k jejich přímé expozici tomuto léčivu. Úmrtnost supů byla způsobena selháním ledvin a vznikem viscerální dny, což korelovalo se zjištěnými zbytkovými koncentracemi diklofenaku v ledvinách. (Oaks a kol., 2004). Díky možné bioakumulaci a biomagnifikaci některých farmak v potravním řetězci, tak mohou být farmakům vystaveni také lidé.

Přítomnost farmak byla zjištěna také v některých velkých městech v pitné vodě v koncentračním rozmezí od jednotek do desítek ng/l (Houtman a kol., 2014; De Jesus Gaffneya kol., 2015). Tyto koncentrace jsou mnohonásobně nižší, než používané terapeutické dávky, proto se riziko spojené s touto expozicí farmakům zdá být zanedbatelné. Nicméně se může jednat o dlouhodobou expozici tvořenou často směsí několika léčiv a jejich metabolitů, jejichž někteří zástupci jsou schopni akumulace v mozku, ledvinách, játrech a jiných tělesných orgánech. Vzhledem k informacím, které jsou v současné době dostupné, nelze negativní působení na člověka touto expozicí zcela vyloučit (Kümmerer, 2009).

Vzhledem ke všem výše jmenovaným rizikům je nutné výskyt farmak v životním prostředí eliminovat nejenom zabráněním jejich vstupu do životního prostředí, ale také odstraněním farmak z lokalit, kde by ladetekována.

2.2. Odstranění farmak z životního prostředí

Farmaka, která se dostávají do životního prostředí, mohou podléhat různým reakcím, které vedou k částečné či úplné degradaci. Při úplné degradaci může dojít k mineralizaci organických sloučenin na oxid uhličitý, sulfát, nitrát a další anorganické sloučeniny. Avšak často se proces degradace zastaví dříve, než dojde k celkové mineralizaci. Vzniklé meziprodukty degradace mohou být stabilnější než jejich mateřské sloučeniny a mohou se lišit v toxicitě a potenciálu k akumulaci (Kümmerer, 2009).

2.2.1. Abiotická degradace farmak

Do abiotických degradačních procesů řadíme hydrolýzu a fotolýzu. Farmaka jsou obvykle odolná proti hydrolýze, proto je hlavním abiotickým procesem přímá či nepřímá fotolýza. Přímá fotolýza je způsobena přímou absorpcí slunečního světla molekulou. Nepřímá fotolýza zahrnuje působení slunečního záření na přirozeně se vyskytující látky např. dusičnany a huminové kyseliny, které vlivem záření způsobují vznik silně oxidujících složek např. hydroxylových radikálů nebo singletového kyslíku, které pak

reagují s danou látkou (Andreozzi a kol., 2003). Přestože řada studií prokázala vliv přímé i nepřímé fotolýzy na rozklad některých zástupců farmak, tyto studie také ukazují, že fotolýzou nedochází k úplnému rozkladu farmak a často při ní vznikají ještě více toxické produkty (Calisto a kol., 2011; DellaGreca a kol., 2004; Isidori a kol., 2005; Trautwein a Kümmerer 2012).

2.2.2. Biologická degradace farmak

Biologické procesy v sobě většinou zahrnují hydrolýzu a konjugaci daných sloučenin a jsou umožněny především díky enzymovému aparátu organismů. Bakterie a houby jsou dvě skupiny organismů, které jsou schopny degradovat širokou škálu organických sloučenin. Houby jsou obzvláště důležité v půdě, bakterie hrají důležitou roli při rozkladných procesech jak v půdě, tak i ve vodě (Kümmerer, 2009).

Degradace farmak v půdě

Studie zabývající se degradací farmak v půdě ukazují, že přirozená mikroflóra je schopná odstraňovat některé zástupce farmak s vysokou účinností (Xu, a kol., 2009; Mrozik a Stefanska, 2014). Rozklad přirozenou mikroflórou však může být velmi pomalý a často dochází k vyplavení farmak dříve, než jsou organismy v půdě schopny je účinně rozložit. Některá farmakase naopak mohou absorbovat na půdní částice, což může snížit biologickou dostupnost dané látky organismům (Mrozik a Stefanska, 2014). K odhadu sorpce jednotlivých látek se často používá jejich hydrofobicita. U farmak však není hydrofobní efekt jediným mechanismem sorpce. Farmaka ve své struktuře mají různé funkční skupiny a díky tomu se na jejich sorpci na pevnou matici mohou podílet také vodíkové můstky, výměny iontů, komplexotvorné reakce (Tolls, 2001), elektrostatické interakce a další fyzikálně-chemické vazby na bakteriální proteiny a nukleové kyseliny (Meakins a kol., 1994). Vzhledem k rozmanité struktuře farmak je tedy odhad jejich sorpce komplikovaný a může být podceněn. Rozklad léčiv v půdě je kromě druhového složení mikroorganismů a vlastností léčiv značně ovlivněn půdním prostředím. Snížení degradační účinnosti bylo pozorováno při vyšších koncentracích organických látek v půdě (Xu a kol., 2009) a za anaerobních podmínek (Mrozik a Stefanska, 2014).

Degradace farmak v čistírnách odpadních vod (ČOV)

Biotická degradace je jedním z hlavních mechanismů využívaných ČOV k odstranění nežádoucích látek z vodného prostředí. Účinnost odstranění farmak z vody průchodem přes ČOV závisí na jejich chemické struktuře a na samotném čistírenském procesu. Ve velkých ČOV je k odstranění nežádoucích látek používán aktivovaný kal, ten však není zcela účinný při odstraňování farmak. V některých ČOV využívajících pouze aktivovaný kal bez terciálního stupně čištění byla účinnost odstranění z odpadní vody u více než poloviny sledovaných farmak nižší než 50 % (Randjenović a kol., 2009; Sipmaa kol., 2010). Díky nedokonalému odstranění farmak průchodem přes ČOV, odtoky z ČOV ovlivňují přítomnost farmak v jejich recipientech (Bendz a kol., 2005; Kasprzyk-Hordern a kol., 2009; Zhou a kol., 2009). Zjištěný úbytek farmak v ČOV navíc nemusí být nutně způsoben jejich rozkladem, ale sorpcí na kal. Čistírenský kal tak může obsahovat vysoké koncentrace farmak, které mohou být zpětně uvolněny do životního prostředí díky ukládání kalu na skládky nebo používání na zemědělské půdy (Randjenovića kol., 2009; Jelic a kol., 2011).

Místo aktivovaného kalu jsou na některých ČOV používány zkrápěné biofiltry, které však mají nižší účinnost odstranění farmak ve srovnání s aktivovaným kalem (Kasprzyk-Horderna kol., 2009). Některé ČOV využívají místo aktivovaného kalu membránové bioreaktory, které sice mají u některých farmak vyšší účinnost odstranění oproti aktivovanému kalu, ale přesto nejsou schopny odstranit farmaka zcela (Randjenović a kol., 2009; Sipma a kol., 2010). Také kořenové ČOV jsou výkonnější při odstraňování farmak oproti konvenčním ČOV. Je to připisováno zejména větší heterogenitě mikrobiálního prostředí a fyzikálně-chemickým podmínkám, kde se mohou střídát aerobní a anaerobní pochody. Přítomné rostliny jsou navíc schopné některá farmaka nejen absorbovat, ale také rozkládat. Kořenové ČOV jsou však značně kapacitně omezeny a nelze je využít pro velké objemy odpadní vody (Zhang a kol., 2014).

Zvýšení účinnosti odstranění farmak na ČOV bylo sledováno po zařazení terciálního stupně čištění, kterým může být např. písková filtrace (Zhou a kol., 2009), písková filtrace s ozonizací (Nakada a kol., 2007), nebo použití granulovaného aktivního uhlí (Grover a kol., 2011). Tyto metody však nejsou dostačující, protože jejich zařazení do procesu čištění odpadních vod nevedlo k úplnému odstranění farmak. Navíc u pískové filtrace a při použití aktivního uhlí nedochází k degradaci farmak, ale pouze k jejich přesunutí do jiné matrice.

Degradace farmak izolovanými organismy

V rámci několika studií byla sledována schopnost jednotlivých organismů, nebo izolovaných skupin organismů rozkládat farmaka v laboratorních podmínkách.

Jednou ze zkoumaných skupin mikroorganismů byly nitrifikační bakterie získané z aktivovaného kalu. U těchto nitrifikačních bakterií byla prokázána schopnost rozkládat 5 hojně užívaných zástupců farmak s různou účinností od 25 do 100 % během 14 denní inkubace. Schopnost rozkladu farmak nitrifikačními bakteriemi je kromě běžně se vyskytujícího enzymového aparátu připisováno také enzymu amoniak monooxygenáze, který má nízkou enzymovou specifitu (Dawas-Massalha a kol., 2014). Další zkoumanou bakterií byl *Bacillus subtilis*, u které byla sledována degradace několika antibiotik po 12 denní inkubaci. Tato bakterie byla schopná snížit koncentraci vybraných antibiotik pouze o 2,4 až 25 % z původní koncentrace 1 mg/l (Al-Gheethia Ismail, 2014). Nízkou účinnost odstranění 5 antibiotik zjistil také Al-Ahmad a kol. (1999) u bakterie *Pseudomonas putida*, jejíž degradační účinnost po 40-ti denní inkubaci byla 0 až 36 % u jednotlivých látek.

Kromě bakterií byla pro degradační pokusy s 6 hojně užívanými farmaky vybrána také řasa *Rhodococcus rhodochrous* a houba *Aspergillus niger*. U těchto mikroorganismů se některá sledovaná farmaka vůbec nedegradovala, nebo byla sledována velmi nízká degradace do 20% (Gauthier a kol., 2010).

Několik studií se zaměřilo také na možnou degradaci farmak rostlinami. Zhang a kol. (2013) sledoval degradaci dvou farmak karbamazepinu a naproxenu mokřadní rostlinou *Scirpus validus*. U této rostliny byla prokázána schopnost degradovat po 21-ti dnech naproxen o 79 až 94 %, u karbamazepinu došlo ke snížení koncentrace pouze vlivem biakumulace a fotodegradace. Také rostliny *Eichhornia crassipes* a *Pistia stratiotes* byly schopné částečně degradovat po 12-ti dnech 4 z 6-ti sledovaných farmak (Lin a Li, 2015).

2.3. Ligninolytické houby

Ligninolytické houby neboli houby bílé hniloby jsou skupinou hub řadící se do basidiomycet a askomycet. Ligninolytické houby jsou díky svému unikátnímu enzymatickému aparátu schopny degradovat heterogenní polyfenolický biopolymer lignin. Samotný rozklad ligninu houbám nepřináší žádný energetický zisk, ale probíhá v rámci kometabolismu, který umožní zpřístupnění dřevních polysacharidů celulózy a hemicelulózy z lignin-celulózových komplexů, které těmto houbám slouží jako zdroj energie (Leonowicz a kol., 1999).

Degradace ligninu je u hub striktně aerobní proces, který je umožněn působením extracelulárních ligninolytických enzymů. Vzhledem k heterogenní struktuře ligninu mají ligninolytické enzymy nízkou substrátovou specifitu a díky ní jsou schopné degradovat i jiné látky, které jsou svojí strukturou ligninu podobné (Pointing, 2001). Řada studií prokázala, že ligninolytické houby jsou schopné degradovat širokou škálu organických polutantů, jako jsou PCB (Čvančarová a kol., 2012), PAU (Leonard a kol., 2007), pesticidy (Mir-Tutusa a kol., 2014), průmyslová syntetická barviva (Wesenberg a kol., 2003), farmaka (Marco-Urrea a kol., 2009), přirozené a syntetické estrogeny (Cajthaml a kol., 2009) aj.

Mezi nejznámější a nejvíce studované druhy patří *Phanerochaete chrysosporium* (kornatec), *Pleurotus ostreatus* (hlíva ústříčná), *Trametes versicolor* (outkovka pestrá), *Pycnoporus cinnabarinus* (outkovka rumělková) a *Panus (Lentinus) tigrinus* (houževnatec tygrovaný).

2.3.1. Enzymový aparát ligninolytických hub

Hlavními ligninolytickými enzymy hub bílé hniloby jsou peroxidázy lignin peroxidáza (LiP, EC 1.11.1.14), mangan-dependentní peroxidáza (MnP, EC 1.11.1.13), verzatilní peroxidáza (VP, EC 1.11.1.13) a fenol oxidáza lakáza (Lac, EC 1.10.3.2). Kromě těchto enzymů se na biodegradaci ligninu podílejí také další enzymy, které nemají schopnost rozkládat lignin samy o sobě. Jsou to např. glyoxaloxidáza (E.C. 1.2.3.5), superoxid dismutáza (E.C. 1.15.1.1) a arylalkohol oxidáza (E.C. 1.1.3.7). Tyto enzymy produkují peroxid vodíku vyžadovaný ligninolytickými peroxidázami, nebo jinak propojují lignocelulosové degradační dráhy (Leonowicz a kol., 1999).

Lignin peroxidáza (LiP, EC 1.11.1.14)

LiP je glykoprotein obsahující hem s molekulovou hmotností v rozmezí 38 až 46 kDa. Pro LiP je charakteristická nízká hodnota pH_{optima} (okolo pH 3). LiP katalyzuje H_2O_2 -dependentní oxidativní depolymerizaci ligninu a oxidaci fenolických i nefenolických aromatických struktur za vzniku arylkationových a fenoxylových radikálů (Wong, 2009). Další reakce katalyzované LiP zahrnují štěpení alifatických řetězců, oxidaci benzylalkoholu a oxidativní i reduktivní dechlorinaci a methoxylaci. LiP byla detekována u kmenů *Phanerochete*, *Trametes* a *Bejkandera* (Singh, 2012).

Mangan-dependentní peroxidáza (MnP, EC 1.11.1.13)

MnP je také glykoprotein obsahující hem a je často produkován ve formě izomerů, jejichž molekulová hmotnost se pohybuje v rozmezí 45 až 55 kDa. Hodnota pH optima se pro MnP pohybuje v kyselé oblasti (pH 3-4). MnP katalyzuje H_2O_2 -dependentní oxidaci Mn^{2+} na vysoce reaktivní Mn^{3+} . Kation Mn^{3+} pak následně oxiduje fenolické části ligninu za vzniku volných radikálů (Wong, 2009). MnP katalyzuje např. mineralizaci fenolů a chlorfenolů, organických barviv a dalších organopolutantů (Pointing, 2001). MnP patří mezi nejběžnější ligninolytické peroxidázy a je produkována téměř všemi basidiomycetními houbami bílé hniloby (Wesenberg a kol., 2003).

Verzatilní peroxidáza (VP, EC 1.11.1.13)

VP je vzhledem ke svým katalytickým vlastnostem označována jako LiP-MnP hybrid. VP obsahuje jak struktury přítomné v LiP tak i v MnP. Díky tomu je schopná katalyzovat nejen oxidaci fenolických a nefenolických aromatických sloučenin za vzniku aromatických radikálů, ale také oxidovat Mn^{2+} na Mn^{3+} (Wesenberg a kol., 2003). Enzym byl popsán u rodů *Pleurotus*, *Bjerkandera* a *Trametes* (Singh, 2012).

Lakáza (Lac, EC 1.10.3.2)

Lac patří do skupiny fenol oxidáz obsahujících ve své struktuře měď. Lac je mnohými houbami produkována ve formě různých izoenzymů. Jedná se o intracelulární i extracelulární enzymy, které mají molekulovou hmotnost v rozmezí 50 až 110 kDa. Lac se kromě rozkladu ligninu podílí na pigmentaci a vzniku spor. Lac má ve své molekule 4 centra obsahující měď ve formě Cu^{2+} a díky tomu je schopná katalyzovat čtyřelektronovou oxidaci redukčního substrátu za současné redukce kyslíku na vodu. Lakáza tímto mechanismem oxiduje fenolické i nefenolické aromatické sloučeniny, které

následněpodléhají depolymerizaci a demethylaci(Wong, 2009). Lakáza je součástí enzymového aparátu téměř všech ligninolytických hub (Wesenberg kol., 2003).

Cytochrom P-450 (P450)

P450 je tvořen skupinou oxidáz se smíšenou funkcí a je součástí enzymového aparátu mnoha organismů. P450 se v buňce nachází v membráně hladkého endoplazmatického retikula a účastní se především metabolismu cizorodých látek. P450 se v menší míře nachází také v membráně mitochondrií, kde se podílí na biosyntéze steroidů. P450 ve své struktuře obsahuje hem a přestože se jednotlivé struktury cytochromů P-450 mohou značně lišit, složení v okolí hemu zůstává silně konzervováno. P450 je schopný katalyzovat celou řadu reakcí, mezi něž patří hydroxylace, oxidativní štěpení C-C vazby, epoxidace, deaminace, dealkylace, dehydrogenace, dehydratace a oxidativní i reduktivní dehalogenace (Gaungerich, 2001).

2.3.2. Degradace farmak ligninolytickými houbami

V několika studiích byla zkoumána degradační účinnost jak celého organismu ligninolytických hub, tak i separovaných ligninolytických enzymů. Degradací pokusy byly opět zaměřeny na farmaka, jejichž výskyt je v prostředí častý.

Marco-Urrea a kol.(2009) zkoumal účinnost degradace ibuprofenu, klofibrové kyseliny a karbamazepinu o koncentraci 10 mg/l od každé látky čtyřmi ligninolytickými houbami- *Trametes versicolor*, *Irpex lacteus*, *Ganoderma lucidum* and *Phanerochaete chrysosporium* po sedmidenní inkubaci při 25°C na tekutém médiu. *T. versicolor* byl schopný degradovat všechna sledovaná farmaka, ibuprofen pod detekční limit, kyselinu klofibrovou z 91% a karbamazepin z 58%. *G. lucidum* degradoval kromě ibuprofenu také karbamazepin ze 47%. Další dva druhy ligninolytických hub byly schopné degradovat pouze ibuprofen. Byla zkoumána také účinnost degradace sérem obsahujícím ligninolytické enzymy lakázu a mangan-dependentní peroxidázu a možný příspěvek cytochromu P-450 přidáním inhibitorů tohoto intracelulárního enzymu do degradačních pokusů. Bylo zjištěno, že na degradaci farmak se kromě ligninolytických enzymů podílí také cytochrom P-450.

Čvanačarová a kol.(2015) zkoumali degradační účinnost 5-ti ligninolytických hub *Irpex lacteus*, *Panus tigrinus*, *Dichomitus squalens*, *Trametes versicolor* a *Pleurotus*

ostreatus u 3 zástupců antibiotik norfloxacinu, ofloxacinu a ciprofloxacinu po 14-ti denní inkubaci na tekutém MEG médiu. Nejvyšší účinnost degradace byla zjištěna u houby *I. lacteus*, která byla schopná zcela rozložit všechny tři sledovaná antibiotika do 10-ti dní. Houba *T. versicolor* rozložila zcela dvě ze sledovaných látek do 14-ti dní a norfloxacin z 85%. U ostatních sledovaných hub se účinnost degradace pohybovala od 0 do 60 %. Přestože u sledovaných antibiotik došlo k poklesu jejich koncentrace, nebyl zjištěn významný pokles v antibiotické aktivitě, naopak u některých vzorků bylo sledováno zvýšení inhibice bakterií až o 90 %, což značí vznik metabolitů s vyšší antibiotickou aktivitou, než měly původní látky.

Tran a kol.(2010) sledoval degradaci 7 nesteroidních antiflogistik a 3 dalších farmak pomocí houby *T. versicolor* během 48 hodinové inkubace při 30°C po přidání farmak do 7 dní narostlého mycelia v tekutém MEG médiu. 5 analgetik bylo zcela degradováno a dalších 5 farmak bylo rozloženo z více jak 63% z původní koncentrace 10 µg/l. Provedený degradační pokus s izolovanou lakázou opět ukázal, že kromě tohoto ligninolytického enzymu se na degradaci některých sledovaných farmak musí podílet také jiné enzymy.

Dobrá degradační účinnost byla zjištěna také u kmenů *Bjerkandera* sp. R1, *Bjerkandera adusta* a *Phanerochaete chrysosporium*, které byly schopny degradovat 8 farmak při 30°C v Kirkově médiu. Mezi sledovanými farmaky byla přítomna 4 psychofarmaka zahrnující antidepresiva citalopram a fluoxetin, antiepileptikum karbamazepin a sedativum diazepam. U 6-ti sledovaných látek včetně citalopramu a karbamazepinu došlo k úplné degradaci všemi sledovanými kmeny ligninolytických hub a u dalších dvou látek diazepamu a fluoxetinu došlo k odstranění od 23 do 57 % z původní koncentrace 1 mg/l (Rodarte-Morales a kol., 2011).

Účinnost ligninolytických hub byla sledována také u reálných farmak kontaminovaných vzorků z ČOV. Rodríguez-Rodríguez a kol.(2011) zkoumal rozklad 14-ti farmak včetně karbamazepinu a diazepamu z čistírenského kalu houbou *T. versicolor*. Pokus probíhal 42 dní v tubách naplněných vysušeným kalem a houbou. U poloviny látek došlo k jejich úplné degradaci, u zbytku se degradační účinnost pohybovala od 42 do 80 % (u diazepamu a karbamazepinu byla degradační účinnost 43 %). Provedené toxikologické testy na *Daphnia magna*, *Vibrio fischeri* a testy klíčivosti semen potvrdily snížení toxicity kalu po degradaci.

Odstranění 24 farmak z aktivovaného kalu bylo sledováno v bioreaktoru s houbou *T. versicolor*. Po 26-ti dnech byla sledovaná farmaka odstraněna s účinností od 26 % výše a u 15-ti látek byla sledována účinnost vyšší než 50% (Rodríguez-Rodríguez a kol., 2012).

T. versicolor byl použit také pro rozklad 10-ti farmak včetně antidepressiva citalopramu za nesterilních podmínek z odpadní vody v bioreaktoru s fluidním ložem. K úplnému odstranění došlo po 8 dnech u sedmi látek včetně citalopramu a u dvoulátek byla sledována účinnost degradace od 32 do 79 %. Na základě toxikologického testu na *Vibrio fischeri* bylo zjištěno postupné snižování toxicity odpadní vody v průběhu degradace (Cruz-Moató a kol., 2013).

Z výše uvedených studií vyplývá, že ligninolytické houby jsou schopné odstraňovat některé běžně se vyskytující zástupce farmak s vysokou účinností. Navíc při rozkladu sledovaných farmak v některých případech docházelo ke snížení toxicity v průběhu degradace. U některých kmenů ligninolytických hub byla také sledována schopnost rozkládat některá těžce biologicky rozložitelná farmaka, jako je např. karbamazepin (Marco-Urrea a kol., 2009). Ligninolytické houby se tedy jeví jako účinný mechanismus k odstranění farmak z životního prostředí. Výzkumy se však zatím zaměřovaly pouze na několik málo zástupců farmak a uvětšiny farmak degradační účinnost těchto hub zatím nebyla zkoumána.

2.4. Sledovaná farmaka

Tato diplomová práce se zaměřuje na 9 látek nalezených v podzemních vodách v blízkosti výroby farmak. Jedná se o 4 farmaka (amitriptylin, dosulepin, chlorprothixen a butamirát), 3 látky používané k výrobě farmak (2-chlorothioxanthon, 2-isopropenylbenzofenon a thiepinon) a 2 látky vznikající jako meziprodukty, při výrobě farmak (karbinol melitracen a karbinol dosulepin).

Amitriptylin (AMI) je široce užívané tricyklické antidepressivum, které působí inhibicí zpětného vychytávání katecholaminů a serotoninu. Používá se při léčbě depresí, úzkosti a neuropatické bolesti (Lednicer, 2009). Přítomnost amitriptylinu byla zjištěna např. v povrchových vodách v USA, Velké Británii, Španělsku, Francii a Ukrajině v řádu jednotek až desítek ng/l (McQuillan a kol., 2002; Kasprzyk-Hordern, 2008; Valcárcel a kol., 2011; Vystavna a kol., 2012). Jeho výskyt v povrchových vodách je dán zejména jeho špatnou biologickou rozložitelností, díky které je odolný vůči degradaci aktivovaným kalem v ČOV (Halling-Sorensen a kol., 1998). Přestože byl na některých ČOV sledován značný úbytek jeho koncentrace (Kasprzyk-Horderna kol., 2009), vzhledem k jeho vysoké

afinitě k sorpci nebyl tento úbytek nejspíš způsobený jeho degradací, nýbrž sorpcí na kal (Bakera Kasprzyk-Hordern, 2011). Amitriptylin byl zjištěn v koncentraci 1,4 ng/l také v pitné vodě ve Francii (Togola a Budzinski, 2008). Možný negativní vliv amitriptylinu na vodní organismy byl zjištěn už ve velmi nízkých koncentracích. U embryí *Danio rerio* se po chronickém vystavení 10ng/l amitriptylinu zkracoval čas jejich líhnutí i jejich délka. Kromě těchto účinků byla ovlivněna také koncentrace adrenokortikotropního hormonu a došlo ke zvýšení oxidačního stresu v *Danio rerio* (Yang a kol., 2014). Amitriptylin je také schopný se akumulovat v játrech ryb (Lajeunesse, 2011).

Dosulepin (DSL) je tricyklické antidepresivum, které působí inhibicí zpětného vychytávání katecholaminů a serotoninu. Stejně jako amitriptylin se používá se k léčbě depresí, úzkosti a neuropatické bolesti (Lancaster aGonzalez, 1989). Dosulepin není často užívané antidepresivum, proto se jeho přítomnost v prostředí nesleduje. Přítomnost dosulepinu byla zjištěna na výtoku některých ČOV ve Velké Británii a v recipientech těchto ČOV se koncentrace dosulepinu pohybovaly do 32 ng/l (Bakera Kasprzyk-Hordern, 2011).

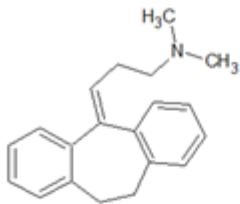
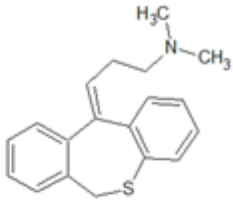
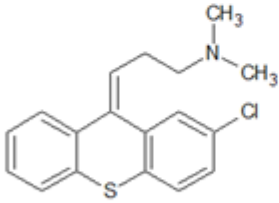
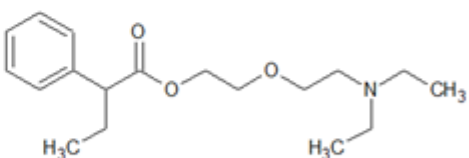
Chlorprothixen (CPX) je antipsychotikum, které je používáno při léčbě psychotických poruch(např.schizofrenie) a akutnímanie (Lüllmann a kol., 2004).

Butamirát(BUT) se řadí do skupiny antitusik s periferním působením. Butamirát tedy působí přímo v průduškách, kde tlumí suchý a dráždivý kašel (Lüllmann a kol., 2004).

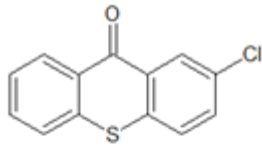
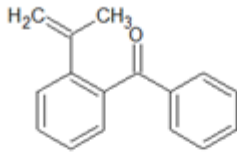
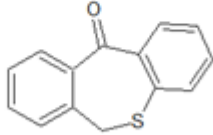
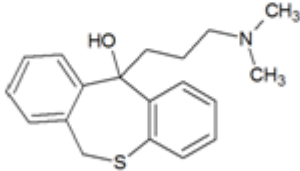
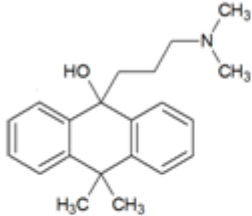
2-chlorothioxanthon (CLT), 2-isopropenylbenzofenon (ISP) a thiepinon (THP) jsou látky, které jsou používány k výrobě farmak. 2-chlorothioxanthon se používá k výrobě antipsychotika chlorprothixenu (US Patent 3,116,291). Thiepinon je látka používaná k výrobě antidepresiva dosulepinu (US Patent 3,609,167).

Karbinol dosulepin (KRD) je meziproduktem při výrobě antidepresiva dosulepinu (US Patent 3,609,167) a karbinol melitracen (KRM) je meziproduktem při výrobě antidepresiva melitracenu (Lednicer, 2009).

Tabulka2:Souhrn chemických struktur a fyzikálně chemických vlastností sledovaných farmak

Amitriptylin		Dosulepin	
			
Terapeutická třída	antidepresivum	Terapeutická třída	antidepresivum
CAS číslo	50-48-6	CAS číslo	113-53-1
Sumární vzorec	$C_{20}H_{23}N$	Sumární vzorec	$C_{19}H_{21}NS$
Molekulová hmotnost	277,40	Molekulová hmotnost	295,44
Log K_{ow}	5	Log K_{ow}	4,5
Chloprothixen		Butamirát	
			
Terapeutická třída	antipsychotikum	Terapeutická třída	antitusikum
CAS číslo	113-59-7	CAS číslo	18109-80-3
Sumární vzorec	$C_{18}H_{18}ClNS$	Sumární vzorec	$C_{18}H_{29}NO_3$
Molekulová hmotnost	315,86	Molekulová hmotnost	307,43
Log K_{ow}	5,2	Log K_{ow}	3,3

Tabulka 3: Souhrn chemických struktur a fyzikálně chemických vlastností sledovaných látek

2-chlorothioxanthon		2-isopropenylbenzofenon	
			
CAS číslo	86-39-5	CAS číslo	50431-89-5
Sumární vzorec	C ₁₃ H ₇ ClOS	Sumární vzorec	C ₁₆ H ₁₄ O
Molekulová hmotnost	246,71	Molekulová hmotnost	222,28
Log K _{ow}	4,6	Log K _{ow}	4,7
Thiepinon		Karbinol dosulepin	
			
CAS číslo	1531-77-7	CAS číslo	1531-85-7
Sumární vzorec	C ₁₄ H ₁₀ OS	Sumární vzorec	C ₁₉ H ₂₃ NOS
Molekulová hmotnost	226,29	Molekulová hmotnost	313,46
Log K _{ow}	3,5	Log K _{ow}	3,4
Karbinol melitracen			
			
CAS číslo	85118-29-2		
Sumární vzorec	C ₂₁ H ₂₇ NO		
Molekulová hmotnost	309,45		
Log K _{ow}	4,2		

2.4.1. Přítomnost sledovaných látek v podzemní vodě

V prosinci roku 2011 byl firmou Aquatest a.s. proveden výzkum podzemních vod v blízkosti výroby farmak FARMAK, a.s. v Olomouci. Farmaka a látky používané nebo vznikající při výrobě farmak byly sledovány celkem v 8 vrtech. Výsledky měření z dané lokality jsou zobrazeny v tabulce 4.

Kontaminace podzemních vod ve sledované lokalitě vznikla před privatizací státního podniku FARMAKON, ke které došlo v roce 1996.

Tabulka 4: Koncentrace farmak a jiných látek v podzemní vodě

Sledovaná látka	Koncentrace v jednotlivých vrtech v µg/l							
	AT-107	SM-33	SM-45	SM-62	SM-63	SM-66	SM-74	SM-75
Amitriptylin	<0,030	<0,030	11,800	19,300	14,200	1,310	12,900	1,250
Dosulepin	<0,030	<0,030	16,100	13,700	71,700	1,580	6,020	1,940
Chlorprothixen	11,000	0,434	28,200	28,300	14,300	2,050	29,100	3,730
Butamirát	<0,030	<0,030	1,550	<0,030	0,039	<0,030	0,347	<0,030
2-Chlorothioxanthon	0,125	0,225	21,600	25,400	23,100	15,800	39,600	3,430
2-isopropenylbenzofenon	9,780	0,959	283,000	4,870	10,200	234,000	1,630	18,500
Thiepinon	16,200	5,810	449,000	68,300	152,000	418,000	90,300	33,000
Karbinol prothiaden	<0,030	<0,030	47,100	15,900	18,200	6,620	0,462	2,100
Karbinol melitracen	1,050	0,096	6,260	0,137	0,740	0,402	0,066	1,300

Zdroj: Aquatest a.s.

4. CÍLE PRÁCE

1. Kvantitativní stanovení farmak ve vzorcích podzemní vody.
2. Stanovení akutní toxicity u sledovaných látek akutním testem toxicity s bakterií *Vibrio fischeri*
3. Zjištění degradační účinnosti houby *Pleurotus ostreatus* u jednotlivých látek a u směsi látek na tekutém maltextrakt-glukózovém médiu.
4. Detekce aktivit ligninolytických enzymů v průběhu degradačních experimentů.
5. Sledování změn akutní toxicity v průběhu degradačního experimentu se směsí látek.

4. MATERIÁL A METODY

4.1. Použitý materiál a přístroje

4.1.1. Standardy sledovaných látek

2-chlorothioxanthon \geq 98%	Sigma-Aldrich, ČR
2-isopropenylbenzofenon \geq 98%	Farmak, ČR
Amitriptylin hydrochlorid \geq 98%	Sigma-Aldrich, Německo
Butamirát \geq 98%	Farmak, ČR
Dosulepin hydrochlorid \geq 98%	Farmak, ČR
Chlorprothixen báze \geq 98%	Sigma-Aldrich, Německo
Karbinol melitracen \geq 98%	Farmak, ČR
Karbinol dosulepin \geq 98%	Farmak, ČR
Thiepinon 98%	Alfa Aesar, Německo

4.1.2. Ostatní chemikálie

2,6-dimethoxyfenol (DMP) 99%	Sigma-Aldrich, Německo
Acetonitril (ACN) pro HPLC	Chem LAB, Belgie
Coomassie Brilliant Blue	Sigma-Aldrich, Německo
Chlorid sodný (NaCl) 99,5%	Sigma-Aldrich, Německo
D-Glukosa monohydrát, p.a.	Lach-Ner, ČR
Diamonná sůl kyseliny 2,2'-azino-bis(3-ethyl-benzothiazolin-6-sulfonové) (ABTS) $>$ 98%	Sigma/Aldrich, Německo
Dimethylsulfoxid \geq 99,9%	Sigma-Aldrich, Německo
Ethanol 96%	Fagron, ČR
Ethylester kyseliny octové (EtAc) pro HPLC	Chromservis, ČR
Hovězí sérový albumin (BSA)	Amresco, USA
Hydroxid amonný 28 – 30%	Sigma-Aldrich, Německo
Hydroxid sodný, p.a.	Lach-Ner, ČR
Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA) \geq 99,9%	Sigma-Aldrich, Německo
Kyselina chlorovodíková 35%, p.a.	Lach-Ner, ČR
Kyselina malonová 99%	Sigma-Aldrich, Německo
Kyselina mravenčí $>$ 98%, p.a.	Sigma-Aldrich, Německo
Kyselina octová 99%, p.a.	Lach-Ner, ČR

Kyselina sírová 96%, p.a.	Lach-Ner, ČR
Kyselina ortho-fosforečná 84–85%, p.a.	Fluka, Německo
Kyselina trifluoroctová $\geq 99\%$, p.a.	Sigma-Aldrich, Německo
Malt extrakt Broth	Oxoid, VB
Methanol (MeOH) pro HPLC	Chromservis, ČR
Monohydrát síranu manganatého $\geq 99,9\%$	Sigma-Aldrich, Německo
Peroxid vodíku $\geq 30\%$	Fluka, Německo
Síran sodný bezvodý, p.a.	Lach-Ner, ČR
SPE Disky ENVI™- 18	Sigma-Aldrich, Německo

4.1.3. Použité přístroje

Autokláv UNISTERI HP	BMT Medical Technology, ČR
Centrifuga MIKRO 120	Hettich, Německo
Detektor diodového pole PDA 2996	Waters, USA
Hmotnostní spektrometr s analyzátozem doby letu LCT Premier XE	Waters, USA
HPLC-UV system Waters 2695 Separations Module	Waters, USA
Kapalinový chromatograf Waters Alliance 2695	Waters, USA
Kolona XBridge 3 C18 (250 x 4,6 mm; 3,5 μm)	Waters, USA
Luminometr m90a	JZD Obránců míru, ČR
pH metr PH03	Labio, ČR
Spektrofotometr Infinite M200 PRO NanoQuant	Tecan, Švýcarsko
Ultra-Turrax T25	IKA Labortechnik, Německo
Ultraúčinný kapalinový chromatografu Acquity UPLC	Waters, USA
Ultrazvuková lázeň K-12	Kraintek, ČR
Vakuová rotační odparka RVO 200A	Ingos, ČR

4.2. Stanovení látek ve vzorcích podzemní vody

V této diplomové práci byla zjišťována koncentrace 9-ti látek AMI, DSL, BUT, CPX, CLT, ISP, THP, KRP a KRM ze tří vrtů podzemních vod v blízkosti výroby farmak. 9 sledovaných látek se ve vzorcích podzemních vod vyskytuje v nízkých a

neměřitelných koncentracích, proto bylo nutné tyto látky nejprve extrahovat na pevnou fázi a z pevné fáze eluovat rozpouštědlem.

4.2.1. Vývoj metodiky extrakce na pevnou fázi

K extrakci na pevnou fázi byl vybrán SPE Disk ENVI™-18 (dále už jen disk) a bylo nutné optimalizovat extrakční podmínky pro nejvyšší výtěžnosti sledovaných látek. Sledována byla výtěžnost extrakce za 4 různých podmínek ve 3 paralelách.

Do 1l destilované vody byl vždy přidán 1ml směsi sledovaných látek rozpuštěných v methanolu (MeOH) o koncentraci 100 mg/l, takže výsledná koncentrace ve vzorku byla 100 µg/l. Vzorky byly před extrakcí vždy okyseleny kyselinou chlorovodíkovou. V prvním extrakčním pokusu (Exp1) byl vzorek před extrakcí okyselen na pH 3,5 a k dvoustupňové eluci z disku bylo použito 30 ml MeOH a následně 30 ml etylesteru kyseliny octové (EtAc). Ve druhém extrakčním pokusu (Exp2) byl vzorek před extrakcí okyselen na pH 3,5 a k eluci z disku bylo použito 30 ml MeOH a 20 ml MeOH s 2% roztokem kyseliny octové v poměru 70:30. Ve třetím extrakčním pokusu (Exp3) byl vzorek před extrakcí okyselen na pH 2,5 a opět z disku eluován 30 ml MeOH a 20 ml MeOH s 2% roztokem kyseliny octové v poměru 70:30. Ve čtvrtém extrakčním pokusu (Exp4) byla směs látek ve vodě před extrakcí okyselená na pH 2,5 a eluována z disku 30 ml MeOH s přidavkem kyseliny octové (0,6%). Před aplikací vzorku byl disk vždy kondicionován postupně 20 ml EtAc, 20 ml MeOH a 20ml MiliQ vody. Následovala aplikace vzorku vody za podtlaku 150kPa a poté byl disk 25 minut sušen za podtlaku 500kPa. Disk byl následně eluován za výše zmíněných podmínek.

Eluce probíhala do odpařovacích baněk (srdcovek), ve kterých byly vzorky zakoncentrovány na vakuové odparce RVO 200A při podtlaku 780 kPa a teploty lázně 45 °C, při 100 otáčkách za minutu. Zakoncentrovaný vzorek byl vypláchnutím elučními činidly kvantitativně převeden do předem zvážených 12ml vialek. Vialky se vzorkem byly opět zváženy a z rozdílu hmotností byl vypočten objem pro stanovení koncentrace vzorku. Vzorky byly měřeny na LC-MS.

4.2.2. Extrakce vzorků podzemní vody na pevnou fázi

Vzorky podzemní vody ze tří vrtů byly odebrány a dodány 29. 5. 2015 firmou Aquatest a.s. ve 2l PET lahvích s 1,8 l podzemní vody z každého vrtu. Vzorky byly skladovány do zpracování v chladu (4°C) a tmě. Podzemní vody byly před extrakcí filtrovány pomocí filtrů ze skleněných mikrovláken o velikosti pórů 0,5 µm. Poté byly vzorky vody okyseleny kyselinou chlorovodíkovou na pH 2,5. Objem analyzovaného vzorku u jednotlivých extrakcí byl 600 ml. Disk byl vždy nejprve kondicionován 20ml EtAc, 20ml MeOH a 20ml MiliQ vody. Následovala aplikace vzorku podzemní vody za podtlaku 150kPa. Poté byl disk 25 minut sušen za podtlaku 500 kPa a poté byl eluován 30 ml MeOH. Methanol byl následně odpařen na vakuové odparce při 780kPa na výsledný objem cca 1ml a byl kvantitativně převeden do předem zvážených 12ml vialek. Vialky se vzorkem byly opět zváženy a z rozdílu hmotností byl vypočten objem pro stanovení koncentrace vzorku. Vzorky byly měřeny na LC-MS.

4.3. Degradální pokusy

Biodegradální účinnost ligninolytické houby *Pleurotus ostreatus* byla sledována v degradačních pokusech na meltextrakt-glukózovém (MEG) médiu s jednotlivými látkami a také v degradačních pokusech se směsí všech 9-ti látek.

4.3.1. Příprava houbové kultury pro degradační pokusy

Bylo připraveno MEG médium (0,5% Malt extrakt Broth a 1% D-glukóza monohydrát) a rozlito po 20 ml do 250 ml Erlenmayerových baněk. Baňky s médiem byly sterilizovány v autoklávu po dobu 30 minut při 121°C pod přetlakem 0,15kPa. Do těchto baněk byly za sterilních podmínek následně přidány 3 disky (o průměru 8mm) ze zásobní kultury *Pleurotus ostreatus* 3004 uchovávané na MEG miskách. *P. osteratus* v baňkách byl inkubován 7 dní při 28°C.

Houbové kultury *P. ostreatus* byly po 7 dnech inkubace homogenizovány za sterilních podmínek přístrojem Ultra-Turrax T25. 1 ml homogenizovaného inokula byl přidáván do sterilizovaných Erlenmayerových baněk s 20 ml tekutého MEG média. Pro degradační pokusy s jednotlivými látkami bylo do baněk následně přidáno 100µl

zásobního roztoku jednotlivých farmak o koncentraci 2000 mg/l rozpuštěných v DMSO, takže výsledná koncentrace jednotlivých látek v tekutém médiu byla 10 mg/l. Pro degradační pokus se směsí všech látek bylo přidáno 200 µl zásobního roztoku směsi látek v DMSO, takže výsledná koncentrace v tekutém médiu byla 2 mg/l.

Kromě degradačních pokusů byly vždy připraveny také usmrcené kontroly (HKC = heat killed control) a biotické kontroly (BK). HKC byla připravena usmrcením 7 dní narostlé houbové kultury v autoklávu a přidáním zásobního roztoku sledovaných látek, ve stejném množství jako u degradačních pokusů. U biotických kontrol byl do MEG média přidán vždy pouze 1 ml homogenizovaného inokula. Baňky byly v průběhu degradačního pokusu inkubovány při 28°C. Degradační pokusy probíhaly vždy ve třech paralelách po dobu 3, 7 a 14 dní.

4.3.2. Příprava vzorků k měření

U degradačních vzorků s jednotlivými látkami byl obsah baněk vždy po 3, 7 a 14 dnech homogenizován přístrojem Ultra-Turrax T25, vzorky byly okyseleny přidáním 200 µl 1M kyseliny chlorovodíkové a kvantitativně převedeny do 100 ml láhví se šroubovacím uzávěrem. Při první extrakci bylo do láhve přidáno 20 ml extrakčního činidla – ethylacetátu, při dalších extrakcích bylo přidáváno 10 ml ethylacetátu. Extrakce proběhla celkem v pěti krocích a po přidání ethylacetátu se láhve vždy nechaly 20 minut třepat v třepačce a poté byly umístěny na 20 minut do ultrazvukové lázně. Organická fáze byla z lahví převedena pomocí skleněné stříkačky do odpařovacích baněk (srdcovek). Po páté extrakci byl extrakt zakoncentrován na přibližný objem 2 ml na vakuové odparce RVO 200A za podtlaku 800 kPa a teploty lázně 45°C, při 100 otáčkách za minutu. Z organické fáze byla odstraněna voda pomocí sušící kolony, která byla připravena nanesením 2 g bezvodého síranu sodného do skleněné stříkačky. Na dno i vršek byl umístěn filtr ze skleněného papíru. Extrakt byl kvantitativně přes tyto síranové kolonky převeden do předem zvážené 12 ml vialky. Vialka s extraktem byla znovu zvážena a z rozdílu hmotností byl vypočten objem ethylacetátu.

Téměř všechny látky vyjma KRMA BUT, byly stanoveny pomocí HPLC-UV. KRM a BUT byl stanoven na LC-MS. Pro analýzu HPLC-UV bylo odebráno 400 µl vzorku a bylo k němu přidáno 600 µl acetonitrilu. Pro analýzu KRM a BUT na LC-MS bylo odebráno 200 µl vzorku, odpařeno do sucha a rozpuštěno v 1 ml methanolu.

Extrakční účinnost ethylacetátu byla pro některá farmaka nízká, proto byla farmaka stanovena také z vodné fáze. Z vodné fáze bylo odebráno 1,5 ml do Eppendorfových mikrozkušavek a odstředěno na centrifuze při 100 otáčkách za sekundu po dobu 10 minut. Z odstředěného vzorku byl odebrán 1 ml vodné fáze a následně stanoven na HPLC-UV, popř. na LC-MS.

U degradačních pokusů se směsí látek byl obsah Erlenmayerových baněk přefiltrován do 40ml předem zvážených vialek. Mycelium zachycené na filtru bylo promyto 5ml methanolu a destilovanou vodou. Vialka se vzorkem byla znovu zvážena a z rozdílů hmotností byl vypočten objem vzorku. Ke stanovení na LC-MS byl odebrán vždy 1ml vzorku.

4.3.3. Stanovení enzymatických aktivit a množství proteinů

Měření enzymové aktivity a množství proteinů probíhalo v průběhu degradačního pokusu každý druhý či třetí den. Byly měřeny aktivity celkem tří skupin enzymů: lakáza (Lac), mangan-dependentní peroxidáza (MnP) a verzatilní peroxidáza (VP). Enzymové aktivity byly měřeny spektrofotometricky na spektrofotometru Infinite M200 PRO NanoQuant. Jedna jednotka enzymové aktivity byla vyjádřena jako množství enzymu, které přemění 1 μmol substrátu za minutu.

Pro výpočet enzymové aktivity byl použit vzorec:

$$EA = (\Delta A \cdot V_{rm}) / (\epsilon_{\lambda} \cdot V_{sam})$$

EA	enzymová aktivita (U/l)
ΔA	změna absorbance reakční směsi za 1 min
V_{rm}	objem reakční směsi
ϵ_{λ}	molární extinkční koeficient enzymového substrátu ($\mu M^{-1} cm^{-1}$)
V_{sam}	objem vzorku

Lakázová aktivita byla měřena pomocí oxidace ABTS při $\lambda = 420$ nm (Matsmura a kol., 1986) s molárním absorpčním koeficientem $\epsilon_{420} = 36000/M/cm$.

Složení reakční směsi ke stanovení Lac:

- 160 μl 120 mmol/l acetát sodný (pH = 5,0)
- 20 μl vzorku
- 20 μl 50 mmol/l ABTS

Aktivita mangan-dependentní peroxidázy a verzatilní peroxidázy byla měřena oxidací DMP při $\lambda = 468$ nm (de Jong a kol., 1994) s molárním absorpčním koeficientem $\epsilon_{468} = 49600/\text{M}/\text{cm}$. Ke zjištění aktivity verzatilní peroxidázy bylo nutné touto metodou měřit také aktivitu lakázy. Výsledné aktivity enzymů byly zjištěny odečtením získaných hodnot z jednotlivých reakčních směsí.

Aktivita lakázy = I

Aktivita mangan-dependentní peroxidázy = II – III

Aktivita verzatilní peroxidázy = III – I

Složení reakční směsi:

- I. a) 170 μl 65,8 mmol/l malonát sodný (pH = 4,5)
 b) 20 μl vzorku
 c) 10 μl 20 mmol/l DMP

- II. a) 150 μl 65,8 mmol/l malonát sodný (pH = 4,5)
 b) 20 μl vzorku
 c) 10 μl 20 mmol/l MnSO_4
 d) 10 μl 10 mmol/l H_2O_2
 e) 10 μl 20 mmol/l DMP

- III. a) 150 μl 65,8 mmol/l malonát sodný (pH = 4,5)
 b) 20 μl vzorku
 c) 10 μl 20 mmol/l EDTA
 d) 10 μl 10 mmol/l H_2O_2
 e) 10 μl 20 mmol/l DMP

Množství proteinů bylo stanoveno pomocí metody popsané Bradfordovou (1976). K 20 μl vzorku bylo přidáno 180 μl činidla dle Bradfordové (50 mgbarviva Coomassie Brilliant Blue, 25 ml etanolu a 50 ml kyseliny fosforečné v 500 ml destilované vody). Po 5 minutách inkubace byly vzorky měřeny při vlnové délce 595nm. Výsledné koncentrace byly odečítány z kalibrační křivky vytvořené pomocí hovězího sérového albuminu z 6 bodů (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

4.4. Použité chromatografické metody

4.4.1. Chromatografické podmínky HPLC-UV

Vzorky z degradačních pokusů jednotlivých látek, vyjma BUT a KRM, byly měřeny na kapalinovém chromatografu Waters Alliance 2695, složený ze separačního modulu Waters 2695 a PDA detektoru Waters 2996. Látky byly separovány pomocí kolony XBridge 3 C18 (250 x 4,6 mm; 3,5 μ m). Složení mobilní fáze a vlnová délka detekce je pro jednotlivé látky uvedena v tabulce 5. Na kolonu byl dávkován vzorek o objemu 20 μ l. Průtok mobilní fáze byl 0,8 ml/min a teplota kolony 40°C.

4.4.2. Chromatografické podmínky LC/MS

Vzorky jednotlivých degradačních pokusů BUT a KRM, degradační směsné vzorky a vzorky z podzemní vody byly analyzovány pomocí ultraúčinného kapalinového chromatografu Acquity UPLC vybaveného detektorem diodového pole PDA 2996 a hmotnostním spektrometrem s analyzátozem doby letu LCT Premier XE. Vzorek o objemu 5 μ l byl dávkován na kolonu Acquity BEH C18 (50 mm \times 2,1 mm; 1,7 μ m) a eluován dvousložkovou mobilní fází – A: 0,1% kyselinou mravenčí ve vodě a B: acetonitril. Separace probíhala při teplotě kolony 40°C, průtokové rychlosti 0,4 ml/min a za použití následujícího lineárního gradientového programu (min/% B): 0/5; 1,5/5; 15/70; 18/99 s následným výplachem kolony (99% B, 1 min) a její ekvilibrací (5% B; 1,5 min). Podmínky detekce hmotnostního spektrometru byly následující: napětí na kapiláře +2800 V; napětí na vstupu do analyzátoru, + 40 V; teplota bloku iontového zdroje, 120°C; teplota desolvatačního plynu – dusíku, 350°C; průtok desolvatačního plynu, 800 L/h; průtok dusíku při vstupu do analyzátoru, 50 L/h. Záznam hmotnostního detektoru byl pořízen v rozsahu hodnot m/z 100–1000. Doba skenu byla 0,15 s, doba mezi skeny činila 0,01 s (při vstupu referentní látky, 0,1 s). Jako referentní látka pro udržení přesné hmoty v průběhu měření (<5 ppm) byl použit leucin-enkefalin (2 ng/ μ l, 5 μ l/min). Data byla vyhodnocena programem MassLynx 4.0 software (Waters, USA) a ke kvantifikaci byl využit QuanLynx Application Manager (Waters, USA).

Tabulka 5: Chromatografické podmínky HPLC-UV pro jednotlivé sledované látky

Sloučenina	Fáze A	Fáze B	Poměr fází A:B	Retenční čas [min]	Vlnová délka [nm]
AMI	0,1 M mravenčan amonný (pH 4,5) s 10 % ACN	100% ACN	30:70	4,42	252
DSL	0,1% kyselina trifluoroctová v 10% roztoku ACN	100% ACN	na začátku fáze A 75 % v průběhu 10 min snížení na 0 %	7,78	231
CPX	10% roztok ACN	100% ACN	50:50	5,35	259
CLT	0,1 M octan amonný (pH 4) s 10 % ACN	100% ACN	20:80	7,26	259
ISP	0,1M octan amonný (pH 4) s 10 % ACN	100% ACN	45:55	6,85	260
THP	10% roztok ACN	100% ACN	40:60	7,95	244
KRD	0,1 M octan amonný (pH 4) s 10 % ACN	100% ACN	25:75	8,04	252

4.5. Testy toxicity

Ke stanovení toxicity 9-ti sledovaných látek byl proveden akutní test toxicity s bakterií *Vibrio fischeri*. U sledovaných látek byla zjišťována koncentrace, která vyvolá 50% inhibici luminiscence *V. fischeri*. Dále byla sledována akutní toxicita v průběhu degradačních pokusů s houbou *P. ostreatus*.

4.5.1. Princip testu toxicity *Vibrio fischeri*

Česká technická norma pro „Jakost vod – Stanovení inhibičního účinku vzorků vod na světelnou emisi *Vibrio fischeri* (Zkouška na luminiscenčních bakteriích)“ EN ISO 11348-2: (2000) popisuje stanovení inhibice luminiscence emitované mořskými bakteriemi *V. fischeri* (kmen NRLL-B-11177) vlivem toxických látek rozpuštěných ve vodě nebo vodném výluhu.

Bakteriální bioluminiscenční test toxicity používá jako testovací organismy zmražené mořské gramnegativní bakterie *V. fischeri*, které emitují světlo, jež vzniká v organismu při chemické reakci katalyzované enzymem luciferázou.



Principem testu je měření redukce bioluminiscence bakterie po kontaktu mezi bakterií a vzorkem, kdy v přítomnosti toxických látek bakterie snižují světelnou emisi.

4.5.2. Příprava bakterií

Bakteriální suspenze *V. fischeri* pro stanovení toxicity byla připravena ze sušených bakterií obsažených v luminiscenčním bakteriálním testu LCK 484 (DR LANGE, Německo), které byly uchovávány při teplotě -18°C až -20°C. Bakterie byly aktivovány přidáním 5ml reaktivačního roztoku vychlazeného na 4°C, který byl součástí balení. Vzniklá suspenze byla inkubována 15 minut při teplotě 15°C. Po 15 minutách byla suspenze promíchána a zředěna 10 ml reaktivačního roztoku.

4.5.3. Měření akutní toxicity jednotlivých látek a směsí látek

Od každé látky byly připraveny standardy v 2% DMSO v 2% roztoku NaCl (20g NaCl v 1 l vody) a byly proměřovány různé koncentrační řady těchto látek.

Vlastní měření probíhalo tak, že do měřicí kyvety bylo napipetováno 500 µl suspenze bakterií vytemperované na 15 °C a byla změřena hodnota signálu luminiscence - napětí [V]. K bakteriím bylo vždy přidáno 500 µl vzorku nebo 500 µl 2% NaCl (k výpočtu předběžného korekčního faktoru) nebo 2% DMSO v roztoku 2% NaCl (k výpočtu korekčního faktoru) vytemperovaných na 15°C. Vzorek byl následně promíchán, aby byla změřena hodnota luminiscence po 15 min a 30 minutách. Mezi měřeními byly vzorky inkubovány při 15°C ve vodní lázni.

Byl vypočítán předběžný korekční faktor, podle následujícího vztahu, který by měl být v rozmezí 0,8–1,2.

Pro výpočet předběžného korekčního faktoru byl použit vzorec:

$$f_p = \frac{L_p}{L_{i0}}$$

f_p předběžný korekční faktor po expozici 15 min

L_p intenzita luminiscence suspenze bakterií po expozici v čase t [V]

L_{i0} intenzita luminiscence suspenze bakterií na počátku testu [V]

Poté byl vypočten korekční faktor, který slouží ke korekci počátečních hodnot L_{i0} všech zkoušených vzorků před jejich použitím jako referenčních hodnot pro stanovení snížené luminiscence. Hodnota korekčního faktoru by měla být po 15 min 0,6 - 1,8, pokud je splněn tento rozsah, je zkouška platná.

Pro výpočet korekčního faktoru byl použit vzorec:

$$f_{kt} = \frac{L_{kt}}{L_{i0}}$$

f_{kt} korekční faktor po expozici 15 min

L_{kt} intenzita luminiscence netoxické kontroly po expozici v čase t [V]

L_{i0} intenzita luminiscence suspenze bakterií na počátku testu [V]

Z naměřených hodnot inhibice bioluminiscence byl proveden výpočet inhibice pomocí následujícího rovnice:

$$I_{it} = 100 - \frac{L_{it}}{f_{kt} \cdot L_{i0}} \cdot 100$$

I_{it} inhibice luminiscence po čase t [%]

f_{kt} korekční faktor po expozici 15 min

L_{i0} intenzita luminiscence suspenze bakterií na počátku testu [V]

Nejprve byla zjišťována koncentrace, která nevyvolá žádný inhibiční efekt a poté nejvyšší koncentrace, která způsobí 100% inhibici luminiscence. Když byly tyto koncentrace nalezeny, byla v jejich rozpětí měřena inhibice luminiscence s minimálním počtem bodů 8.

Na základě inhibice záření při různých koncentracích byla sestavena křivka v programu OriginPro 8.5 (OriginLab Corporation, USA), kde na ose x byl logaritmus koncentrace a na ose y sledovaná inhibice záření. Z této křivky byla zjištěna hodnota EC_{50} .

4.5.4. Měření akutní toxicity degradačních pokusů

Z degradačních vzorků bylo odebráno 5 ml média a lyofilizováno. Následně byl vzorek rozpuštěn v 2% DMSO v 2% roztoku NaCl na příslušnou koncentraci. Samotné měření probíhalo stejně, jako měření akutní toxicity jednotlivých látek.

Byla zjišťována koncentrace sledovaných vzorků, která se vztahovala ke kontrolám. Pomocí koncentrační řady bylo zjištěno vhodné ředění HKC, které způsobí inhibici luminiscence v měřitelné oblasti, tj. kolem 50 %. Výsledné ředění HKC, které vytvoří koncentraci způsobující inhibici v měřitelné oblasti je poté aplikováno na vzorky a stejným způsobem měřeno. Z naměřených hodnot byla opět spočítána inhibice v % stejným způsobem jako u měření toxicity jednotlivých látek.

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

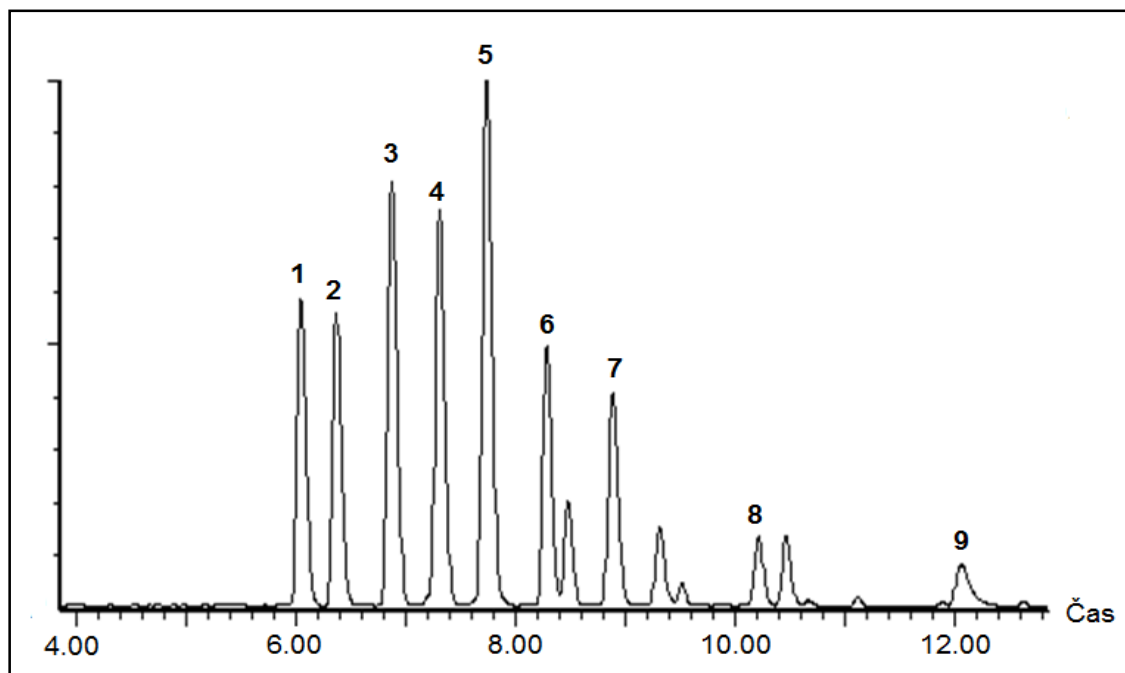
5.1. Stanovení farmak na LC/MS

Tabulka 6: Retenční časy, kvantifikační ionty a kalibrační parametry LC/MS metody

Sloučenina	Retenční čas [min]	Kvantifikační iont [m/z]	LOQ [μg/l]	R ²
AMP	7,80	278,19	1	0,995
DSL	7,33	296,15	1	0,998
CPX	8,33	316,09	1	0,998
BUT	6,90	308,22	5	0,996
CLT	12,19	247,00	2	0,999
ISP	8,92	223,11	5	0,999
THP	10,29	227,05	2	0,999
KRD	6,42	316,16	1	0,997
KRM	6,08	310,22	1	0,997

LOQ – limit kvantifikace; R² – koeficient determinace

Obrázek 1: LC/MS chromatogram 9-ti sledovaných látek



Karbinol melitracen (1), karbinol dosulepin (2), butamirát (3), dosulepin (4), amitriptylin (5), chlorprothixen (6), 2-isopropenylbenzofenon (7), thiepinon (8), 2-chlorothioxanthon (9)

5.2. Analýza podzemních vod

5.2.1. Vývoj metodiky extrakce na C-18 disky

Ke stanovení 9-ti látek ze vzorků podzemní vody byla vyvíjena metodika extrakce na C-18 disky. Sledovala se výtěžnost extrakce při různém okyselení vody a použití různých elučních činidel. Podrobné výsledky jsou zobrazeny v příloze diplomové práce v tabulkách 9 až 12.

Při okyselení vody před extrakcí na pH 3,5 byla eluční účinnost methanolu u některých látek nízká a k eluci zbytkové koncentrace látek z disku bylo nutné použít další eluční činidlo. Nejvyšší účinnosti bylo dosaženo při použití MeOH s 2% kyselinou octovou v poměru 70:30 jako následného elučního činidla. Při okyselení vody před extrakcí na pH 2,5 bylo sledováno zvýšení eluční účinnosti methanolu a použití druhého elučního činidla směsi methanolu s 2% kyselinou octovou v poměru 70:30 již nevykazovalo výrazné zvýšení celkové eluční účinnosti. Methanol měl také vyšší eluční účinnost než methanol s přidanou kyselinou octovou (0,6 %). Analyzované vzorky podzemní byly tedy před extrakcí okyseleny na pH 2,5 a k eluci z disku byl použit methanol.

5.2.2. Koncentrace sledovaných látek ve vzorcích podzemní vody

Farmaka a další látky zjištěné v podzemních vodách v blízkosti výroby farmak nebyly od prosince roku 2011 v této lokalitě sledovány. Proto byla v diplomové práci provedena analýza podzemních vod, ke zjištění aktuální koncentrace sledovaných látek.

Analýza podzemních vod ukázala přítomnost některých sledovaných látek ve vysokých koncentracích. Nejvyšší koncentrace byla zjištěna u THP 227,9 µg/l a ISP 113,9 µg/l ve vrtu SM-66. CLT byl zjištěn v nejvyšší koncentraci 38,9 µg/l ve vrtu SM-45. Ve vrtu SM-45 byly sledovány také nejvyšší koncentrace AMI 11,3 µg/l, DSL 7,2 µg/l a KRD 7,2 µg/l. U CPX a BUT se koncentrace pohybovaly v řádu jednotek až stovek ng/l. KRM nebyl ani v jednom z vrtů detekován (tabulka 7).

Tabulka 7: Koncentrace sledovaných látek ve vzorcích podzemní vody

Sloučenina	Koncentrace v $\mu\text{g/l}$			Výtěžnost extrakce [%]
	vrt SM-45	vrt SM-66	vrt SM-74	
AMP	11,320 \pm 0,821	0,009 \pm 0,004	0,179 \pm 0,044	97,61 \pm 7,152
DSL	7,173 \pm 0,716	0,006 \pm 0,001	0,077 \pm 0,013	96,74 \pm 6,985
CPX	0,876 \pm 0,312	ND	0,009 \pm 0,003	103,55 \pm 5,333
BUT	0,230 \pm 0,001	0,007 \pm 0,002	0,041 \pm 0,045	79,50 \pm 3,188
CLT	38,882 \pm 6,694	3,095 \pm 0,329	3,984 \pm 0,515	96,67 \pm 3,278
ISP	14,070 \pm 0,553	113,866 \pm 3,560	1,577 \pm 0,531	101,50 \pm 7,018
THP	15,666 \pm 1,209	227,867 \pm 4,785	1,882 \pm 0,179	63,38 \pm 6,513
KRD	7,218 \pm 0,180	0,009 \pm 0,001	0,041 \pm 0,013	98,74 \pm 3,659
KRM	ND	ND	ND	75,10 \pm 10,3

Přítomnost antidepresiv AMI a DSL ve vodném prostředí byla sledována také jinými autory. Nejvyšší koncentrace AMI a DSL byly zjištěny v odpadních vodách ve Velké Británii, kde koncentrace AMI byla 5,14 $\mu\text{g/l}$ (Kasprzyk-Horderna kol., 2009) a koncentrace DSL 418,7 ng/l (Baker a Kasprzyk-Hordern, 2013). Nejvyšší koncentrace AMI hlášená ve vodném prostředí vyjma odpadních vod je z řeky Calder ve Velké Británii, kde jeho koncentrace dosáhla 71,6 ng/l. DSL byl v této řece také zjištěn v maximální koncentraci 32,2 ng/l (Baker a Kasprzyk-Hordern, 2011). Zjištěné koncentrace AMI a DSL v analyzovaných podzemních vodách jsou tedy značně vyšší než koncentrace zjištěné v povrchových vodách a jsou také vyšší než maximální zjištěné koncentrace těchto farmak v odpadních vodách.

Přítomnost ostatních sledovaných látek nebyla v dostupných studiích v životním prostředí sledována. Zjištěné koncentrace CLT, ISP, THP a KRD se vyrovnají nejvyšším koncentracím, které byly zjištěny u nejpoužívanějších skupin farmak (nesteroidních antiflogistik, antibiotik, beta-blokátorů, antilipidemik a antiepileptik) v komunálních odpadních vodách. Koncentrace těchto skupin farmak se zde pohybují od jednotek ng/l až po desítky $\mu\text{g/l}$ ve výjimečných případech stovky $\mu\text{g/l}$ (Kasprzyk-Hordern a kol., 2009; Gracia-Lor a kol., 2012; Baker a Kasprzyk-Hordern, 2013). Koncentrace v odpadních vodách z nemocnic jsou u některých farmak sice vyšší, ale jejich maximální hodnoty zjištěné v provedených studiích byly také v řádu desítek až stovek $\mu\text{g/l}$ (Langfort a Thomas, 2009; Lin a Tsai, 2009). V povrchových a podzemních vodách přijímajících vodu

z čištěných a nečištěných odpadních vod byly zjištěny koncentrace farmak v koncentracích od jednotek ng/l až po jednotky µg/l (Sacher a kol., 2001; Bendz a kol., 2005; Baker a Kasprzyk-Hordern, 2013). Stejně koncentrace některých skupin farmak (zejména antibiotik a nesteroidních antiflogistik) byly zjištěny také ve vodách ovlivněných chovy hospodářských zvířat s maximálními koncentracemi v řádu jednotek µg/l (Kemper, 2008; Lin a kol., 2008).

Velmi vysoké koncentrace farmak byly zjištěny v některých odpadních vodách z výroby farmak. Larsson a kol. (2007) zjistil vysoké koncentrace antibiotik v odpadních vodách z jejich produkce v Indii, kde se jejich koncentrace pohybovala v řádu desítek µg/l až desítek mg/l. Fick a kol. (2009) sledoval také přítomnost antibiotik v odpadní vodě z výroby farmak a v okolních jezerech. Antibiotika v odpadní vodě i ve sledovaných jezerech dosahovala maximálních koncentrací v řádu stovek µg/l až jednotek mg/l. Ne vždy jsou zjištěné koncentrace farmak v odpadních vodách z jejich produkce vysoké. Lin a kol. (2008) zjišťoval koncentrace různých skupin farmak v odpadní vodě z výroby farmak na Taiwanu, kde se nejvyšší koncentrace pohybovala v řádu jednotek až desítek µg/l.

5.3. Akutní testy toxicity s *Vibrio fischeri*

Kromě amitriptylinu zatím nebyl u sledovaných látek zjišťován akutní toxický vliv na vodní organismy, proto byla stanovena akutní toxicita sledovaných látek na bakterii *Vibrio fischeri*.

V toxikologickém testu s *Vibrio fischeri* byla zjištěna 50% inhibice luminiscence tohoto organismu (EC_{50}) po 15-ti minutové expozici koncentračním řadám jednotlivých látek. U 4 látek 2-chlorthioxanthonu, 2-isopropenylbenzofenonu, karbinolu melitracenu, karbinolu dosulepinu nemohla být hodnota EC_{50} stanovena díky nedostatečné rozpustnosti těchto látek v 2% DMSO. Nejvyšší toxicitu vykazuje thiepinon s hodnotou EC_{50} 5,45 mg/l. Naopak nejnižší toxicita byla sledována u antitusika butamirátu s hodnotou EC_{50} 131,98 mg/l. U sledovaných psychofarmak se pak hodnota EC_{50} pohybovala od 43 do 70 mg/l (tabulka 8).

Tabulka 8: Výsledky akutních testů toxicity s *Vibrio fischeri*

Sloučenina	EC ₅₀	
	μmol/l	mg/l
Amitriptylin	155,56	43,15
Dosulepin	236,16	69,77
Chlorprothixen	189,79	59,95
Butamirát	429,30	131,98
2-chlorothioxanthon	>40,53	> 10,00
2-isopropenylbenzofenon	> 224,10	> 50,00
Thiepinon	24,12	5,45
Karbinol dosulepin	> 79,76	> 50,00
Karbinol melitracen	> 161,58	> 25,00

Z provedených testů toxicity vyplývá, že sledované látky jsou akutně toxické až při velmi vysokých koncentracích. Vysoké hodnoty EC₅₀ v rozmezí stovek μg/l až stovek mg/l byly zjištěny také u jiných psychofarmak v akutních testech toxicity provedených na různých druzích organismů (Henry a kol., 2004; Johnson a kol., 2007; Minguez a kol., 2014).

Akutní toxicita byla v dostupných studiích u sledovaných látek zjišťována pouze pro amitriptylin. Hodnota EC₅₀ amitriptylinu byla v provedeném testu toxicity s *Vibrio fischeri* 43,15 mg/l (155,56 μM/l), což je vyšší hodnota, než byla zjištěna v dostupných studiích s jinými organismy. Hodnota EC₅₀ amitriptylinu v testu toxicity s bakterií *Photobacterium phosphoreum* byla 77,8 μM/l po 15-ti minutové expozici a se třemi korýši (*Streptocephalus proboscideus*, *Daphnia magna* a *Artemia salina*) 2,8 μM/l, 20 μM/l a 133 μM/l po 24 hodinové expozici (Calleja a kol., 1994). Minguez a kol. (2014) zjistil hodnotu EC₅₀ u korýše *Daphnia magna* 4,82 mg/l po 48 hodinové expozici amitriptylinu. Kromě akutních testů toxicity byly sledovány také chronické účinky amitriptylinu. Yang a kol. (2014) zjistil zkrácení času líhnutí a délky embryí *Danio rerio* po 5-ti denní expozici koncentraci 10 ng/l amitriptylinu, což je koncentrace, která je mnohonásobně nižší, než pozorovaná koncentrace, která vyvolá akutní toxicitu.

Zjištěné hodnoty EC₅₀ se u jednotlivých testovaných organismů liší, proto provedený toxikologický test s *Vibrio fischeri* může podcenit akutní toxicitu sledovaných látek. Navíc nevypovídá nic o možných chronických účincích farmak, které mohou být u

organismů vyvolány již při mnohem nižších koncentracích, než které byly zjištěny v akutních testech toxicity.

5.4. Biodegradace farmak houbou *Pleurotus ostreatus*

5.4.1. Výsledky degradace sledovaných látek

K degradačním pokusům byla vybrána houba *P. ostreatus*, která prokázala výborné degradační schopnosti pro mnoho organických polutantů. Čvančarová a kol. (2012) zkoumala degradaci PCB s různými druhy ligninolytických hub a pouze *P. ostreatus* byl schopný degradovat penta a hexachlorované bifenylly na tekutých médiích. Navíc bylo v průběhu degradace PCB zjištěno výrazné snížení toxicity. Cajthaml a kol. (2009) zase ukazuje, že *P. ostreatus* byl jednou z nejvíce účinných ligninolytických hub při degradaci xenoestrogenů. *P. ostreatus* je schopný s vysokou účinností degradovat také např. některá barviva (Novotný a kol., 2001) PAU (Schützendübel a kol., 1999) a pesticidy (Purnomo a kol., 2010; Purnomo a kol., 2013).

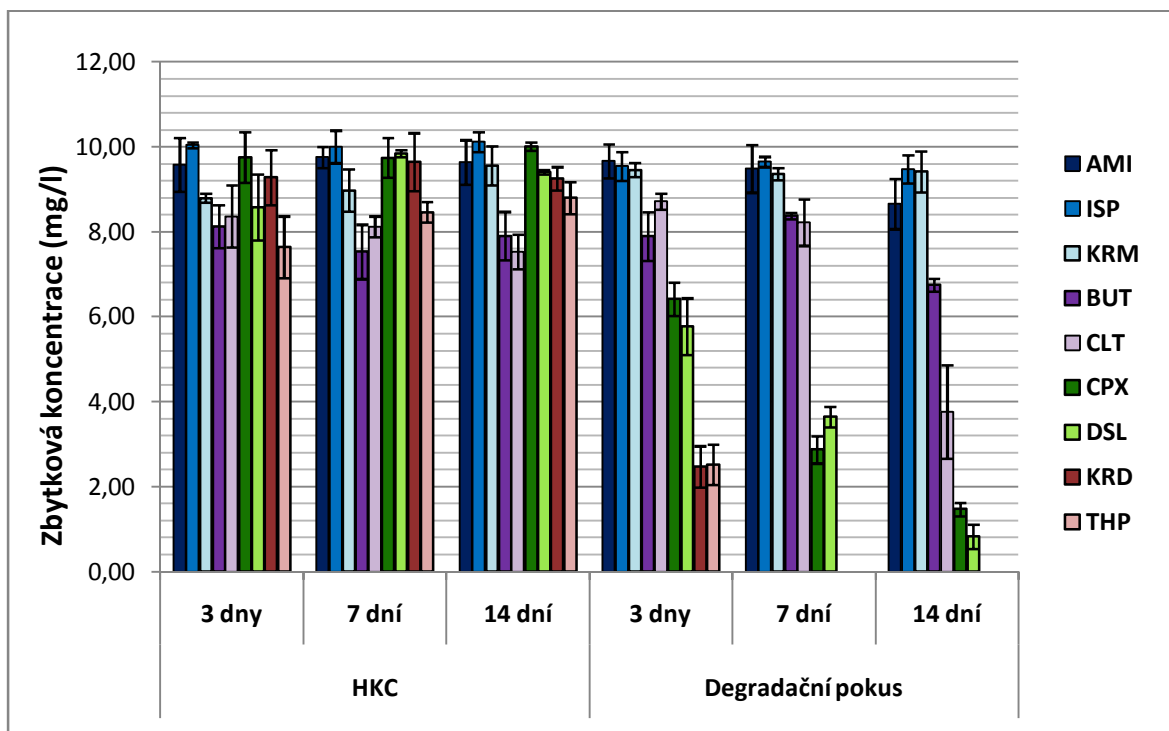
Biodegradační účinnost houby *P. ostreatus* byla sledována v této diplomové práci v degradačních pokusech s jednotlivými látkami a se směsí všech 9-ti látek.

V degradačních pokusech s jednotlivými farmaky byl sledován úbytek 5-ti z 9-ti sledovaných látek. U CPX, DSL, KRD a THP bylo snížení jejich koncentrace v tekutém médiu zjištěno již po 3 dnech, u CLT až po 14-ti dnech inkubace. Nejvyšší úbytek byl sledován u THP a KRD, jejichž zbytková koncentrace se třetí den pohybovala kolem hodnoty 2,5 mg/l a sedmý den již nebyly v médiu detekovány vůbec. Farmaka CPX a DSL byly v průběhu degradačního pokusu odstraněny s vysokou účinností 85 % a 91 %. CLT byl degradován až mezi sedmým a čtrnáctým dnem o 62 % (graf 1).

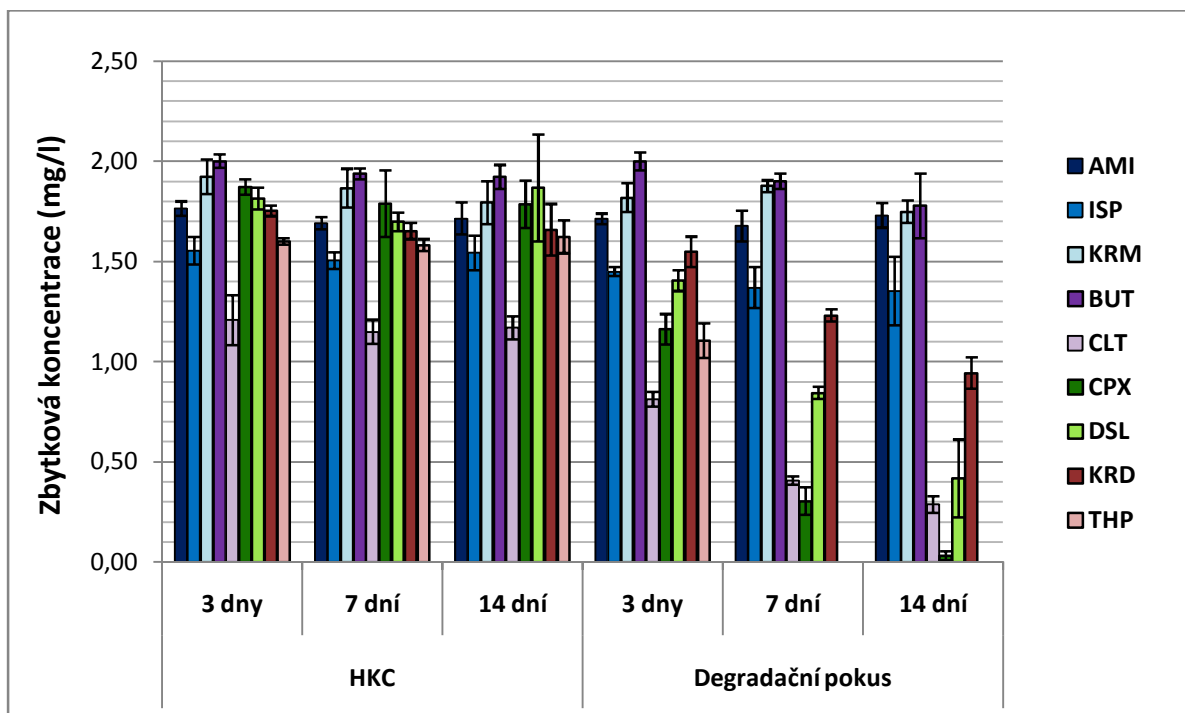
Ve směsném vzorku látek byl zjištěn úbytek koncentrace opět u 5-ti látek CLT, CPX, DSL, KRD a THP. Rychlá degradace byla sledována u THP, který nebyl již sedmý den v tekutém médiu detekován. CPX a DSL byly stejně jako v předchozích pokusech postupně degradovány a 14tý den byl úbytek jejich koncentrace 98 % a 79 %. KRD byl ve směsném pokusu degradován s nižší účinností než v pokusu předchozím, jeho celkové snížení koncentrace v tekutém médiu po 14-ti dnech bylo 52 %. Naopak CLT byl ve směsném vzorku degradován rychleji a již třetí den byl sledován úbytek této látky. Úbytek

CLT byl zjištěn také v HKC, což bylo nejspíš způsobeno absorpcí na mycelium houby nebo abiotickou degradací. Koncentrace CLT po 14-ti dnech inkubace byla o 75 % nižší oproti HKC (graf 2).

Graf 1: Souhrnné výsledky deградаčních pokusů jednotlivých látek



Graf 2: Výsledky směsného deградаčního pokusu



Žádná degradace nebyla zjištěna v dekadačních pokusech s *P.ostreatus* u AMI, ISP, KRM a BUT (testováno t-testem s 5% hladinou významnosti), jedná se tedy o obtížně rozložitelné látky. Špatná rozložitelnost byla v minulosti prokázána pro AMI, u kterého nebyla zjištěna žádná degradace aktivovaným kalem používaným v ČOV (Halling-Sorensen a kol., 1998). AMI nebyl degradován ani ligninolytickou houbou *Trametes versicolor* (Nguyen a kol., 2014), která pro řadu jiných farmak z různých terapeutických skupin byla velmi účinná v jejich odstranění (Tran a kol., 2010; Cruz-Moató a kol., 2013).

AMI je společně s DSL ve stejné terapeutické skupině tricyklických antidepresiv a jsou si strukturně velmi podobné, přesto u nich byla zjištěna rozdílná biodegradace houbou *P. ostreatus*. U AMI nebyla pozorována žádná degradace a DSL byl degradován ze 79 a 91 %. Také u ostatních látek byla sledována různá míra degradace i přes jejich strukturní podobnost. Podobné výsledky při degradaci ligninolytickými houbami v rámci stejných terapeutických skupin farmak byly zjištěny také například u dvou zástupců jiné skupiny antidepresiv (selektivních inhibitorů serotoninu) citalopramu a fluoxetinu. Citalopram byl degradován po sedmidenní inkubaci zcela a fluoxetin pouze z 23 do 46 % v závislosti na použitém druhu ligninolytických hub (Rodarte-Morales a kol., 2011). Rozdílná účinnost degradace ligninolytickými houbami v rámci stejné terapeutické skupiny farmak byla také pozorována např. u fluorochinolonových antibiotik (Čvančarová a kol., 2015) nebo nesteroidních antiflogistik odvozených od kyseliny propanové (Rodríguez-Rodríguez a kol., 2012).

Biologický rozklad látek je umožněn díky enzymovému aparátu organismů a proto někdy i nepatrné změny v chemické struktuře látek, mohou mít vliv na jejich afinitu k enzymu a jejich celkovou degradaci (Kümmrer, 2009). Příkladem mohou být PCB, které se od sebe liší v počtu a poloze chlórů. Bylo zjištěno, že s přibývajícím počtem chlórů se schopnost degradace ligninolytickými houbami snižuje. Také poloha navázaných chlórů, hraje významnou roli při degradaci, kdy jsou nejvíce degradovány PCB, které mají navázané chlory v poloze ortho a nejméně v poloze para (Kubátová a kol., 2001). Umístění chlórů v PCB navíc ovlivňuje prostorovou strukturu látek, méně planární sloučeniny jsou pak degradovány lépe (Moeder a kol., 2005).

DSL na rozdíl od AMI má ve své cyklické struktuře zabudovanou síru. Také další sledované látky v této diplomové práci se zabudovanou sírou ve struktuře byly degradovány. Naopak u látek, které síru ve své cyklické struktuře neobsahovaly, nebyla zjištěna žádná degradace. Zabudováním síry do cyklické struktury se mění prostorová struktura molekuly, což je dáno změnou v délce vazby a valenčních úhlů v místě vazby síry

(Katritzky, 1985). Odlišnost v prostorové struktuře látky vlivem přítomnosti síry tedy nejspíše umožňuje lepší navázání látek na enzymy, a díky tomu mohly být tyto látky degradovány.

Jak ukazují některé studie, schopnost degradace ligninolytických hub může být ovlivněna použitým substrátem (Schützendübel a kol., 1999; Čvančarová a kol., 2012). Nelze tedy vyloučit, že při použití jiného substrátu než MEG média může být *P. ostreatus* schopný rozložit i látky, u kterých nebyla zjištěna žádná degradace v průběhu provedeného pokusu.

5.4.2. Enzymová aktivita ligninolytických enzymů v průběhu degradace

Biodegradčních reakcí ligninolytických hub se mohou účastnit jejich ligninolytické enzymy, proto byla v průběhu degradačního pokusu měřena aktivita Lac, MnP a VP. Dále bylo sledováno množství proteinů měřené činidlem dle Bradfordové. Enzymové aktivity a množství proteinů při degradačních pokusech jednotlivých látek jsou zobrazeny v grafech 7 až 34 v příloze této diplomové práce. Enzymové aktivity a množství proteinů ze směsného degradačního pokusu jsou zobrazeny v grafech 4 až 6 na str. 49.

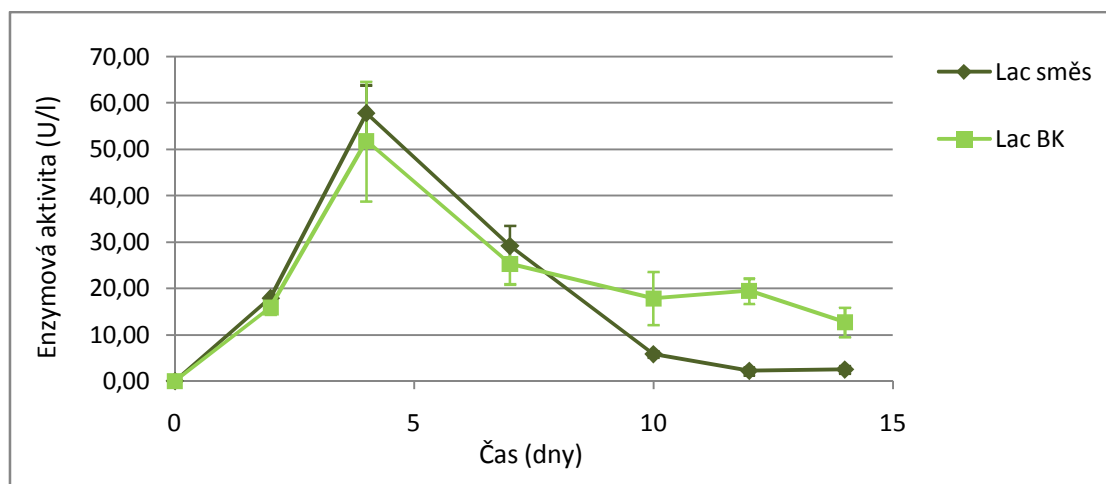
Nejvyšší aktivity v průběhu degradace dosáhla Lac, u ostatních ligninolytických enzymů MnP a VP byla aktivita velmi nízká, nebo žádná, vzhledem k tomu lze předpokládat, že hlavním ligninolytickým enzymem podílejícím se na degradaci sledovaných látek by mohla být Lac. Marco-Urrea (2009) zjistil, že na degradaci některých farmak se kromě ligninolytických enzymů může podílet také cytochrom P-450.

Množství produkovaných ligninolytických enzymů a jejich aktivita může být v průběhu degradace ligninolytickými houbami ovlivněna přítomnými látkami. Zvýšení aktivity ligninolytických enzymů v průběhu degradačních pokusů bylo sledováno např. v přítomnosti PCB (Čvančarová a kol., 2012), některých polycyklických aromatických uhlovodíků a jejich metabolitů (Covino a kol., 2010). Naopak ke snížení aktivity ligninolytických enzymů došlo např. v přítomnosti endokrinního disruptoru triklosanu (Cajthaml a kol., 2009).

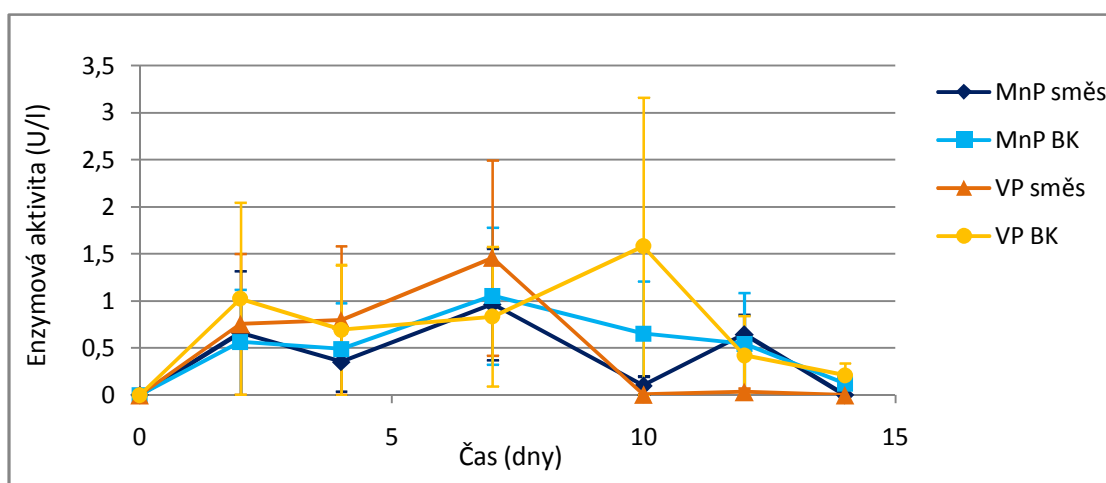
V degradačních pokusech s jednotlivými látkami nebyl zjištěn žádný výrazný rozdíl v aktivitě ligninolytických enzymů oproti biotickým kontrolám. Ve směsném degradačním pokusu byl zjištěn výrazný pokles aktivity Lac oproti biotické kontrole 10-tý den

degradace. Toto snížení enzymové aktivity bylo nejspíše způsobeno vznikem toxických produktů, které u *P. ostreatus* způsobily inhibici v produkci Lac.

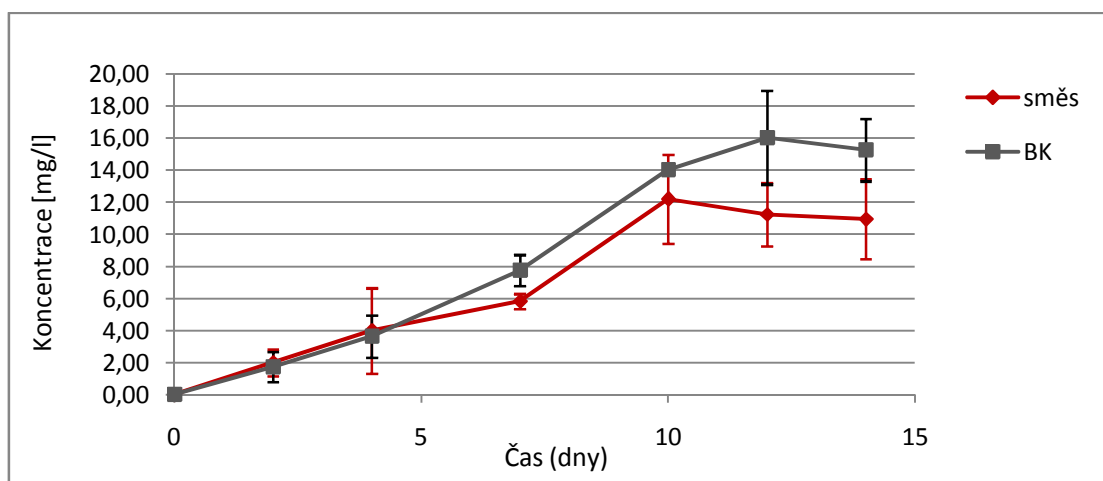
Graf 3: Enzymová aktivita Lac u směsného degradačního pokusu



Graf 4: Enzymová aktivita MnP a VP



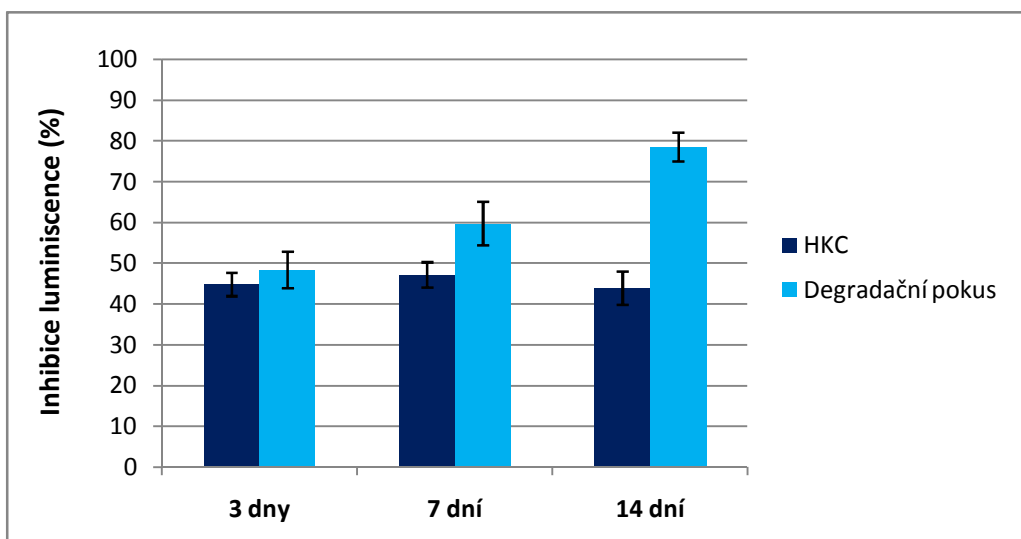
Graf 5: Množství proteinů



5.4.3. Toxicita tekutého média v průběhu degradace

V průběhu biodegradačního pokusu se směsí látek byly zjišťovány změny v akutní toxicitě tekutého média. V těchto testech byla opět sledována inhibice bioluminiscence emitované bakterií *Vibrio fischeri*. Nejprve bylo pomocí koncentrační řady zjištěno ředění vzorku HKC, které vyvolá přibližně 50% inhibici, a následně bylo výsledné ředění aplikováno na vzorky z degradačních pokusů. Z výsledků toxikologického testu lze usuzovat, zda v průběhu degradace dochází ke vzniku toxičtějších metabolitů než původní látky.

Graf 6: Inhibice luminiscence bakterie *Vibrio fischeri* v průběhu degradace



Toxikologické testy s *V. fischeri* potvrdily zvyšování akutní toxicity v průběhu degradace. Po 14-ti dnech byla sledována o 34 % vyšší inhibice luminiscence než u HKC (graf 6). Při degradaci tedy nejspíš vznikají více toxické metabolity, než byly původní látky.

Řada autorů popisuje snížení toxicity v průběhu degradace ligninolytickými houbami u různých organických polutantů zahrnujících např. polychlorované bifenylly (Čvančarová a kol., 2012), některé pesticidy (Mir-Tutusaus a kol., 2014) a endokrinní disruptory (Cajthaml a kol., 2009). Několik autorů sledovalo pokles toxicity také po biodegradaci různých skupin farmak z kontaminovaného kalu a odpadní vody houbou *Trametes versicolor* (Rodríguez-Rodríguez a kol., 2011; Cruz-Morato a kol., 2013). Naopak zvýšení akutní toxicity při biodegradačních pokusech s ligninolytickými houbami bylo sledováno například u nesteroidního antiflogistika ibuprofenu (Marco-Urrea a kol., 2009), nebo některých fluorochinolonových antibiotik (Čvančarová a kol., 2015).

Vznik metabolitů je závislý, jak na struktuře dané látky, tak i na metabolických drahách jednotlivých druhů organismů. Použitím jiného substrátu v degradačních pokusech s *P. ostreatus*, nebo použitím jiného druhu ligninolytických hub by mohlo dojít k tvorbě jiných metabolitů a také k jejich rozdílné toxicitě.

6. ZÁVĚR

Degradační účinnost ligninolytické houby *Pleurotus ostreatus* byla zkoumána pro 4 farmaka a 5 látek používaných nebo vznikajících při výrobě farmak. Vysoký obsah těchto látek byl v roce 2011 detekován v blízkosti výroby farmak. Analýza podzemních vod provedená v rámci této diplomové práce potvrdila výskyt sledovaných látek v podzemních vodách ve vysokých koncentracích, a proto byla zkoumána jejich možná degradace houbou *Pleurotus ostreatus*.

Houba *P. ostreatus* byla schopná snížit koncentraci 5-ti látek z 9-ti o 52 až 100 % po 14-ti dnech kultivace na maltextrakt-glukózovém médiu. V průběhu degračního pokusu byla měřena aktivita tří ligninolytických enzymů mangan-dependentní peroxidázy, verzatilní peroxidázy a lakázy (Lac), z nichž hlavní vliv na degradaci sledovaných látek mohla mít na základě zjištěných aktivit pouze Lac. U směsného degračního pokusu bylo od desátého dne degradace pozorováno snížení aktivity Lac. Enzymová aktivita byla nejvíce inhibována vznikem toxických metabolitů v průběhu degradace. Na vznik produktů toxičtějších než původní látky poukazují také provedené testy akutní toxicity s *Vibrio fischeri*, kde byla na konci degradace sledována o 34% vyšší inhibice luminiscence této bakterie oproti kontrolám.

V budoucích degračních pokusech s houbou *P. ostreatus* doporučuji použít různé substráty, které by mohly zvýšit degrační účinnost této houby a zároveň by mohly mít vliv na vznikající metabolity. Dále by do degračních pokusů měly být zahrnuty další druhy ligninolytických hub, především *Trametes versicolor*, u kterého byla v několika studiích prokázána vysoká účinnost při odstranění farmak z životního prostředí.

LITERATURA

Al-Ahmad, A., Daschner, F.D., Kummerer K., Biodegradability of cefotiam, ciprofloxacin, meropenem, penicillin G, and sulfamethoxazole and inhibition of waste water bacteria. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 37, 158-63.

Al-Gheethi, A.A.S., Ismail, N., (2014). Biodegradation of Pharmaceutical Wastes in Treated Sewage Effluents by *Bacillus subtilis* 1556WTNC. *Environmental Processes* 1, 459–481.

Andreozzi, R., Marotta, R., Paxéus, N., 2003. Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. *Chemosphere* 50, 1319–1330.

Backhaus, T., Grimme, L.H., 1999. The toxicity of antibiotic agents to the luminescent bacterium *Vibrio fischeri*. *Chemosphere* 38, 3291–3301.

Baker, D.R. & Kasprzyk-Hordern, B., 2011. Multi-residue analysis of drugs of abuse in wastewater and surface water by solid-phase extraction and liquid chromatography–positive electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1218, 1620–1631

Baker, D.R. & Kasprzyk-Hordern, B., 2013. Spatial and temporal occurrence of pharmaceuticals and illicit drugs in the aqueous environment and during wastewater treatment: New developments. *Science of the Total Environment* 454–455, 442–456.

Bendz, D., Paxéus, N. A., Ginn, T. R., Loge, F. J., 2005. Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Höje River in Sweden. *Journal of Hazardous Materials* 122, 195–204.

Bradford, M.M., 1976. Rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.

Brooks, B.W., Chambliss, C.K., Stanley, J.K., Ramirez, A., Banks, K.E., Johnson, R.D., Lewis, R.J., 2005. Determination of selected antidepressants in fish from an effluent-dominated stream. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24, 464–469.

Cajthaml, T., Křesinová, Z., Svobodová, K., Möder, M., 2009. Biodegradation of endocrine-disrupting compounds and suppression of estrogenic activity by ligninolytic fungi. *Chemosphere* 75, 745–750.

Calisto, V., Domingues, M. R. M., Esteves, V. I., 2011. Photodegradation of psychiatric pharmaceuticals in aquatic environments e Kinetics and photodegradation products. *Water Research* 45, 6097 – 6106.

Calleja, M.C., Persoone, G., Geladi, P., 1994. Comparative acute toxicity of the first 50 multicentre evaluation of in vitro cytotoxicity chemicals to aquatic non-vertebrates. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 26, 69–78.

Cleuvers, M., 2003, Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects, *Toxicology Letters* 142, 185 – 194

Covino, S., Svobodová, K., Křesinová, Z., Petruccioli, M., Federici, F., D'Annibale, A., Čvančarová, M., Cajthaml, T., 2010. In vivo and in vitro polycyclic aromatic hydrocarbons degradation by *Lentinus (Panus) tigrinus* CBS 577.79. *Bioresource Technology* 101, 3004–3012.

Crane, M., Watts, C., Boucard, T., 2006. Chronic aquatic environmental risks from exposure to human pharmaceuticals. *Science of the Total Environment* 367, 23–41.

Cruz-Morató, C., Ferrando-Climent, L., Rodriguez-Mozaz, S., Barceló, D., Marco-Urrea, E., Vicent, T., Sarra, M., 2013. Degradation of pharmaceuticals in non-sterile urban wastewater by *Trametes versicolor* in a fluidized bed bioreaktor. *Water Research* 47, 5200–5210.

Čvančarová, M., Křesinová, Z., Filipová, A., Colvino, S., Cajthaml, T., 2012. Biodegradation of PCBs by ligninolytic fungi and characterization of the degradation products. *Chemosphere* 88, 1317–1323.

Čvančarová, M., Moeder, M., Filipová, A., Cajthaml, T., 2015. Biotransformation of fluoroquinolone antibiotics by ligninolytic fungi – Metabolites, enzymes and residual antibacterial activity. *Chemosphere* 136, 311–320.

Dawas-Massalha, A., Gur-Reznik, S., Lerman, S., Sabbah, I., Dosoretz, C.G., 2014. Co-metabolic oxidation of pharmaceutical compounds by a nitrifying bacterial enrichment. *Bioresource Technology* 167, 336–342.

De Jesus Gaffney, V.J., Almeida, C.M.M., Rodrigues, A., Ferreira, E., Benoliel, M.J., Cardoso, V.V., 2015. Occurrence of pharmaceuticals in a water supply system and related human health risk assessment. *Water Research* 72, 199–208.

De Jong, E., Cazemier, A. E., Field J.A., Debont, J. A. M., 1994. Physiological-Role of Chlorinated Aryl Alcohols Biosynthesized De-Novo by the White-Rot Fungus *Bjerkandera* Sp. Strain Bos55. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 271–277.

De Lange H.J., Noordoven, W., Murk, A.J., Lurling, M., Peeters, E.T.H.M., 2006. Behavioural responses of *Gammarus pulex* (Crustacea, Amphipoda) to low concentrations of pharmaceuticals, *Aquatic Toxicology* 78, 209–216.

DellaGreca, M., Fiorentino, A., Isidori, M., Lavorgna, M., Previtera, L., Rubino, M., Temussi, F., 2004. Toxicity of prednisolone, dexamethasone and their photochemical derivatives on aquatic organisms. *Chemosphere* 54, 629–637.

Farré, M., Pérez, S., Kantiani, L., Barceló, D., 2008. Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment. *Trends in Analytical Chemistry* 27, 991–1007.

- Ferrari, B., Paxéus, N., Lo Giudice, R., Pollio, A., Garric, J., 2003. Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibric acid, and diclofenac. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 55, 359-370.
- Fick, J., Södeström, H., Linberg, R.H., Phan, C., Tysklind, M., Larsson, J.D.G., 2009. Contamination of surface, ground and drinking water from pharmaceutical production, *Environmental Toxicology and Chemistry* 28, 2522–2527
- Flaherty, C.M. & Dodson, S.I., 2005. Effects of pharmaceuticals on *Daphnia* survival, growth, and reproduction. *Chemosphere* 61, 200–207.
- Fong, P.P., 1998. Zebra mussel spawning is induced in low concentrations of putative serotonin reuptake inhibitors. *The Biological Bulletin* 194, 143–149.
- Gauthier, H., Yargeau, V., Cooper, D.G., 2010. Biodegradation of pharmaceuticals by *Rhodococcus rhodochrous* and *Aspergillus niger* by co-metabolism. *Science of the Total Environment* 408, 1701–1706.
- Guengerich, F.P., 2001. Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chemical Research in Toxicology* 14, 611-650.
- Gracia-Lor, E., Sancho, J.V., Serrano, R., Hernández, F., 2012. Occurrence and removal of pharmaceuticals in wastewater treatment plants at the Spanish Mediterranean area of Valencia. *Chemosphere* 87, 453–462.
- Grover, D.P., Zhou, J.L., Frickers, P.E., Readman, J.W., 2011. Improved removal of estrogenic and pharmaceutical compounds in sewage effluent by full scale granular activated carbon: Impact on receiving river water. *Journal of Hazardous Materials* 185, 1005-1011.
- Halling-Sorensen, B., Nors Nielsen, S., Lanzky, P.F., Ingerslev, F., Holten Luthoft, H.C., Jorgensen, S.E., 1998. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment – a review. *Chemosphere* 36, 357–393.
- Heberer, T., 2002. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicology letters* 131, 5–17
- Henry, T.B., Kwon, J.W., Armbrust, K.L., Black, M.C., 2004. Acute and chronic toxicity of five selective serotonin reuptake inhibitors in *Ceriodaphnia dubia*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23, 2229–2233.
- Hernando, M.D., Petrovic, M., Fernandez-Alba, A.R., Barcelo, D., 2004. Analysis by liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry and acute toxicity evaluation for beta-blockers and lipid-regulating agents in wastewater samples. *Journal of Chromatography A*, 1046, 133–140.
- Houtman C.J., Kroesbergen, J., Lekkerkerker-Teunissen, K., van der Hoek J.P., 2014. Human health risk assessment of the mixture of pharmaceuticals in Dutch drinking water and its sources based on frequent monitoring data, *Science of the Total Environment* 496, 54–62.

Hudggett, D.B., Brooks, B.W., Peterson, B., Foran, C.M., Schlenk, D., 2002. Toxicity of select beta adrenergic receptor-blocking pharmaceuticals (B-blockers) on aquatic organisms. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 43, 229–235.

Huerta B., Rodríguez-Mozaz, S., Barceló, D., 2012. Pharmaceuticals in biota in the aquatic environment: analytical methods and environmental implications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 404, 2611–2624

Isidori, M., Lavorqna, M., Nardelli, A., Parella, A., Previtera, L., Rubino, M., 2005. Ecotoxicity of naproxen and its phototransformation products. *Science of The Total Environment* 348, 93–101.

Jelic, A., Gros, M., Ginebreda, A., Cespedes-Sánchez, R., Ventura, F., Petrovic, M., Barcelo, D., 2011. Occurrence, partition and removal of pharmaceuticals in sewage water and sludge during wastewater treatment. *Water Research* 45, 1165–1176.

Kasprzyk-Hordern, B., Dinsdale, R.M., Guwy, A.J., 2008. The occurrence of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs in surface water in South Wales, UK. *Water Research* 42, 3498–3518.

Kasprzyk-Hordern, B., Dinsdale, R.M., Guwy, A.J., 2009. The removal of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs during wastewater treatment and its impact on the quality of receiving waters. *Water Research* 43, 363– 380.

Katritzky, A.R., 1985. *Handbook of Heterocyclic Chemistry*. Pergamon Press, Oxford, Great Britain.

Kemper, N., 2008. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial Environment. *Ecological indicators* 8, 1-13.

Kubátová, A., Erbanová, P., Eichlerová, I., Homolka, I., Nerud, F., Šašek, V., 2001. PCB congener selective biodegradation by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus* in contaminated soil, *Chemosphere*, 43, 207–215.

Kümmerer, K., 2009, The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use – present knowledge and future challenges, *Journal of Environmental Management* 90, 2354–2366.

Lajeunesse, A., Gagnon, C., Gagne, F., Louis, S., Cejka, P., Sauve, S., 2011. Distribution of antidepressants and their metabolites in brook trout exposed to municipal wastewaters before and after ozone treatment-evidence of biological effects. *Chemosphere* 83, 564–571.

Lancaster, S.G. & Gonzalez, J.P., 1989. Dothiepin. *Drugs* 38, 123-147.

Larsson, D.G., de Pedro, C., Paxeus, N., 2007. Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. *Journal of Hazardous Materials* 148, 751–755.

Lednicer, D., 2009. Strategies for organic drug synthesis and design. 2nd Edition. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.

Leonardi, V., Šašek, V., Petruccioli, M., D'Annibale, A., Erbanová, P., Cajthaml, T., 2007. Bioavailability modification and fungal biodegradation of PAHs in aged industrial soils. *International Biodeterioration & Biodegradation* 60, 165–170.

Leonowicz, A., Matuszewska, A., Luterek, J., Ziegenhagen, D., Wojtas-Wasilewska, M., Cho, N.-S., Hofrichter, M., Rogalski, J., 1999, Biodegradation of lignin by white rot fungi, *Fungal Genetics and Biology* 27, 175-185.

Li, W.C. 2014. Occurrence, sources, and fate of pharmaceuticals in aquatic environment and soil. *Environmental Pollution* 187, 193–201.

Lin, Y.-L. a Li, B.-K., 2015. Removal of pharmaceuticals and personal care products by *Eichhornia crassipes* and *Pistia stratiotes*. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 000 (2015) 1–6.

Lin, A.Y.C., Yu, T.H., Lin, C.F., 2008. Pharmaceutical contamination in residential, industrial, and agricultural waste streams: Risk to aqueous environments in Taiwan. *Chemosphere* 74, 131–141.

Lin, A.Y.-C. a Tsai, Y.-T., 2009. Occurrence of pharmaceuticals in Taiwan's surface waters: Impact of waste streams from hospitals and pharmaceutical production facilities. *Science of The Total Environment* 407, 3793 – 3802.

Longford, K.H. a Thomas, K.V., 2009. Determination of pharmaceutical compounds in hospital effluents and their contribution to wastewater treatment works. *Environment International* 35, 766–770.

López-Serna, R., Jurado, A., Vázquez-Suné, E., Carrera, J., Perović, M., Barceló, D., 2013. Occurrence of 95 pharmaceuticals and transformation products in urban groundwaters underlying the metropolis of Barcelona, Spain. *Environmental Pollution* 174, 305–315.

Lüllmann, H., Mohr, K., Wehling, M., 2004. Farmakologie a toxikologie. Překlad 15., zcela přepacovaného vydání. Grada Publishing a.s., Praha.

Marco-Urrea, E., Pérez-Trujillo, M., Vicent, T., Caminal, G., 2009. Ability of white-rot fungi to remove selected pharmaceuticals and identification of degradation products of ibuprofen by *Trametes versicolor*. *Chemosphere* 74, 765–772.

Matsumura, E., Yamamoto, E., Numata, A., Kawano, T., Shin, T., Murao, S., 1986. Structure of the laccase-catalyzed oxidation products of hydroxy-benzoic acids in the presence of ABTS (2,2'-azino-di-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)). *Agricultural and Biological Chemistry* 50, 1355-1357.

McQuillan, D., Hopkins, S., Chapman, T.H., Sherrell, K., Mills, D., Drug Residues in Ambient Water: Initial Surveillance in New Mexico, USA. 7th Annual New Mexico Environmental Health Conference, October 28-30, 2002, Albuquerque, New Mexico.

- Meakins, N.C., Bubb, J.M., Lester, J.N., 1994. Fate and behavior of organic micropollutants during wastewater treatment process: a review. *International Journal of Environment and Pollution* 4, 27–58.
- Mimeault, C., Woodhouse, A.J., Miao, H.-S., Metcalfe, C.D., Moon, T.W., Trudeau, V.L., 2005. The human lipid regulator, gemfibrozil bioconcentrates and reduces testosterone in the goldfish, *Carassius auratus*, *Aquatic Toxicology* 73, 44–54.
- Minguez, L., Farcy, E., Ballandonne, C., Lepailleur, A., Serpentine A., Lebel, J.-M., Bureau, R., Halm-Lemeille, M.-P. 2014. Acute toxicity of 8 antidepressants: What are their modes of action? *Chemosphere* 108, 314–319.
- Mir-Tutusaus, J. A., Masís-Mora, M., Corcellas, C., Eljarrat, E., Barceló, D., Sarrà, M., Caminal, G., Vicent, T., Rodríguez-Rodríguez, C.E., 2014. Degradation of selected agrochemicals by the white rot fungus *Trametes versicolor*. *Science of The Total Environment* 500–501, 235–242
- Mrozik, W. aStefanska, J., 2014. Adsorption and biodegradation of antidiabetic pharmaceuticals in soils, *Chemosphere* 95, 281–288.
- Moeder, M., Cajthaml, T., Koeller, G., Erbanová, P., Šašek, V., 2005. Structure selectivity in degradation and translocation of polychlorinated biphenyls (Delor 103) with a *Pleurotus ostreatus* (oyster mushroom) culture. *Chemosphere* 61, 1370–1378.
- Nakada, N., Shinohara, H., Murata, A., Kiri, K., Managaki, S., Sato, N., Takada, H., 2007. Removal of selected pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) and endocrine-disrupting chemicals (EDCs) during sand filtration and ozonation at a municipal sewage treatment plant. *Water Research* 41, 4373–4382.
- Novotný, Č., Rawal, B., Bhatt, M., Patel, M., Šašek, V., 2001. Capacity of *Irpex lacteus* and *Pleurotus ostreatus* for decolorization of chemically different dyes. *Journal of Biotechnology* 89, 113–122.
- Oaks, J.L, Gilbert, M., Virani, M.Z, Watson, R.T, Meteyer, C.U, Rideout, B.A., Shivaprasad, H.L., Ahmed, S., Chaudhry, M.J.I., Arshad, M., Mahmood, S., Ali, A., Khan, A.A., (2004). Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan. *Nature* 427, 630–633
- Peng, X., Ou, W., Wang, C., Wang, Z., Huang, Q., Jin, J., Tan, J., 2014. Occurrence and ecological potential of pharmaceuticals and personal care products in groundwater and reservoirs in the vicinity of municipal landfills in China. *Science of the Total Environment* 490, 889–898.
- Petrie, B., Barden, R., Kasprzyk-Hordern, B., 2015. A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: Current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring. *Water Research* 72, 3–27.
- Pointing, S.B., 2001. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* 57, 20–33.

Purnomo, A.S., Mori, T., Kamei, I. Nishii, T., Kondo, R., 2010. Application of mushroom waste medium from *Pleurotus ostreatus* for bioremediation of DDT-contaminated soil. International Biodeterioration & Biodegradation 64, 397-402.

Purnomo, A. S., Mori, T., Putra, S. R., Kondo, R. 2013. Biotransformation of heptachlor and heptachlor epoxide by white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. International Biodeterioration & Biodegradation 82, 40–44.

Radjenović, J., Petrović, M., Barceló, D., 2009. Fate and distribution of pharmaceuticals in wastewater and sewage sludge of the conventional activated sludge (CAS) and advanced membrane bioreactor (MBR) treatment. Water Research 43, 831-841.

Rodarte-Morales, A., Feijoo, G., Moreira, M. & Lema, J. 2011. Degradation of selected pharmaceutical and personal care products (PPCPs) by white-rot fungi. World Journal Microbiology and Biotechnology, 27, 1839-1846.

Rodríguez-Rodríguez, C.E., Jelić, A., Llorca, M., Farré, M., Caminal, G., Petrović, M., Barceló, D., Vicent, T., 2011. Solid-phase treatment with the fungus *Trametes versicolor* substantially reduces pharmaceutical concentrations and toxicity from sewage sludge. Bioresource technology 102, 5602–5608.

Rodríguez-Rodríguez, C.E., Barón, E., Gago-Ferrero, P., Jelić, A., Llorca, M., Farré, M., Díaz-Cruz, M.S., Eljarrat, E., Petrović, M., Caminal, G., Barceló, D., Vicent, T., 2012. Removal of pharmaceuticals, polybrominated flame retardants and UV-filters from sludge by the fungus *Trametes versicolor* in bioslurry reactor. Journal of Hazardous Materials 233-234, 235–243.

Runnalls, T.J., Hala, D.N. , Sumpter, J.P., 2007. Preliminary studies into the effects of the human pharmaceutical Clofibrac acid on sperm parameters in adult Fathead minnow, Aquatic Toxicology 84, 111–118.

Sacher, F., Lange, F.T., Brauch, H.-J., Blankenhorn, I., 2001. Pharmaceuticals in groundwaters Analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Württemberg, Germany. Journal of Chromatography A 938, 199–210.

Santos, L.H.M.L.M., Gros, M., Rodriguez-Mozaz, S., Delerue-Matos, C., Pena. A., Barceló, D., Montenegro, M.C.B.S.M., 2013. Contribution of hospital effluents to the load of pharmaceuticals in urban wastewaters: Identification of ecologically relevant pharmaceuticals. Science of the Total Environment 461, 302–316.

Schützendübel, A., Majcherczyk, A., Johannes, C., Hüttermann, A., 1999. Degradation of fluorene, anthracene, phenanthrene, fluoranthene, and pyrene lacks connection to the production of extracellular enzymes by *Pleurotus ostreatus* and *Bjerkandera adusta*. International Biodeterioration & Biodegradation 43, 93–100.

Singh, S.N., 2012. Microbial degradation of xenobiotics. Environmental Science and Engineering, Springer-Verlag. Berlin Heidelberg.

Sipma, J., Osuna, B., Collado, N., Monclús, H., Ferrero, G., Comas, J., Rodríguez-Roda, I., 2010. Comparison of removal of pharmaceuticals in MBR and activated sludge systems. *Desalination* 250, 653–659.

Ternes, T. A., 1998. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers, *Water Research* 32 (11), 3245–3260.

Togola, A., Budzinski, H., 2008. Multi-residue analysis of pharmaceutical compounds in aqueous samples. *Journal of Chromatography A* 1177, 150–158.

Tolls, J., 2001. Sorption of veterinary pharmaceuticals in soils: a review. *Environmental Science Technology* 35, 3397–3406.

Tran, N.H., Urase, T., Kusakabe, O., 2010. Biodegradation characteristics of pharmaceutical substances by whole fungal culture *Trametes versicolor* and its laccase. *Journal of Water and Environmental Technology* 8, 125–140.

Trautwein, C. & Kümmerer, K., 2012. Degradation of the tricyclic antipsychotic drug chlorpromazine under environmental conditions, identification of its main aquatic biotic and abiotic transformation products by LC–MSn and their effects on environmental bacteria. *Journal of Chromatography B* 889–890, 24–38.

Triebkorn, R., Casper, H., Heyd, A., Eikemper, R., Köhler, H.-R., Schwaiger, J., 2004. Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac Part II. Cytological effects in liver, kidney, gills and intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology* 68, 151–166.

Valcárcel, Y., Alonso, S.G., Rodríguez-Gil, J.L., Gil, A., Catalá, M., 2011. Detection of pharmaceutically active compounds in the rivers and tap water of the Madrid Region (Spain) and potential ecotoxicological risk. *Chemosphere* 84, 1336–1348.

Vernouillet, G., Eullaffroy, P., Lajeunesse, A., Blaise, C., Gagné, F., Juneau, P., 2010. Toxic effects and bioaccumulation of carbamazepine evaluated by biomarkers measured in organisms of different trophic levels. *Chemosphere* 80, 1062–1068.

Vystavna, Y., Huneau, F., Grynenko, V., Vergeles, Y., Celle-Jeanton, H., Tapie, N., Budzinski, H., Le Coustumer, P., (2012). Pharmaceuticals in Rivers of Two Regions with Contrasted Socio-Economic Conditions: Occurrence, Accumulation, and Comparison for Ukraine and France. *Water, Air, & Soil Pollution* 223, 2111–2124.

Wesenberg, D., Kyriakides, I., Agathos, S. N., 2003. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnology Advances* 22, 161–187.

Wong, D.W.S., 2009. Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 157, 174–209.

Wong, D.W.S., 2009. Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 157, 174–209.

Xu, J., Wu, L., Chang, A.C., 2009. Degradation and adsorption of selected pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in agricultural soils. *Chemosphere* 77, 1299–1305.

Yang, M., Qiu, W., Chen, J., Zhan, J., Pan, C., Lei, X., Wu, M., 2014. Growth inhibition and coordinated physiological regulation of zebrafish (*Danio rerio*) embryos upon sublethal exposure to antidepressant amitriptyline. *Aquatic Toxicology* 151, 68–76.

Zhang, D.Q., Hua, T., Gersberg, W., Yhu, J., Ng, W.J., Tan, S.K., 2013. Carbamazepine and naproxen: Fate in wetland mesocosms planted with *Scirpus validus*. *Chemosphere* 91, 14–21.

Zhang, D., Gersberg, R.M., Ng, W.J., Tan, S.K., 2014. Removal of pharmaceuticals and personal care products in aquatic plant-based systems: A review, *Environmental Pollution* 184, 620–639.

Zhou, J.L., Zhang, Z.L., Banks, E., Grover, D., Jiang, J.Q., 2009. Pharmaceutical residues in wastewater treatment works effluents and their impact on receiving river water. *Journal of Hazardous Materials* 166, 655–661.

Patenty a normy:

ČSN EN ISO 11348-2 (2000): Česká technická norma: Jakost vod – Stanovení inhibičního účinku vzorků vod na světelnou emisi *Vibrio fischeri* (Zkouška na luminiscenčních bakteriích) – Část 2: Metoda se sušenými bakteriemi.

US Patent 3,609,167: French Lab, Kline, S. IBENZO{8 b,e{9 {0 THIEPINES. US Patent 3,609,167, Sept 28, 1971.

US Patent 3,116,291 A: As, K. 9-(propene-3-ylidene-1), and 9-[3'-(nu-hydroxyalkyl)piperazino-nu)-propylidene], xanthenes and thiaxanthenes, and processes for their preparation. US Patent 3,116,291 A, Dec. 31, 1963.

PŘÍLOHY

Tabulka 9: Výtěžnost Exp1: okyselení vody před extrakcí na pH 3,5 a použití elučních činidel methanolu a EtAc

	1. extrakce			2. extrakce			3. extrakce			Průměrná celková extrakční účinnost Exp1
	MeOH	EtAc	Celkem	MeOH	EtAc	Celkem	MeOH	EtAc	Celkem	
AMI	49,89	0,23	50,13	77,82	0,11	77,93	48,59	0,22	48,81	58,95 ± 13,43
DSL	69,65	0,33	69,98	53,49	0,54	54,03	52,28	0,51	52,79	58,93 ± 7,83
CPX	33,10	0,82	33,91	43,47	0,95	44,42	32,65	1,04	33,69	37,34 ± 5,01
BUT	70,67	0,25	70,92	91,01	0,00	91,01	59,87	0,32	60,19	74,04 ± 12,78
CLT	95,45	5,77	101,22	101,96	2,46	104,42	95,06	4,32	99,38	101,67 ± 2,08
ISP	100,07	1,93	102,00	97,50	2,13	99,63	104,76	1,56	106,32	102,65 ± 2,77
THP	63,47	2,62	66,09	68,15	2,48	70,63	60,12	3,02	63,14	66,62 ± 3,08
KRM	83,36	2,09	85,45	71,54	2,53	74,07	70,30	3,08	73,38	77,63 ± 5,53
KRD	96,33	0,09	96,43	65,13	1,04	66,17	83,61	0,34	83,95	82,18 ± 12,41

Tabulka 10: Výtěžnost Exp2 – okyselení vody před extrakcí na pH 3,5 a použití elučních činidel methanolu a methanolu s 2% roztokem kyseliny octové v poměru 70:30 (k.oct.).

	1. extrakce			2. extrakce			3. extrakce			Průměrná celková extrakční účinnost Exp2
	MeOH	MeOH s 2% k. oct.	Celkem	MeOH	MeOH s 2% k. oct.	Celkem	MeOH	MeOH s 2% k. oct.	Celkem	
AMI	75,77	21,51	97,29	52,09	39,11	91,21	57,09	38,74	95,83	94,78 ± 2,59
DSL	73,88	6,08	79,96	68,14	14,47	82,61	71,44	30,00	101,44	88,00 ± 9,56
CPX	43,99	11,40	55,39	41,53	17,64	59,17	24,70	28,26	52,96	55,84 ± 2,56
BUT	88,24	15,40	103,64	65,43	36,66	102,10	67,06	44,10	111,16	105,63 ± 3,96
CLT	92,12	0,00	92,12	95,39	0,00	95,39	97,01	0,00	97,01	94,84 ± 2,04
ISP	101,17	0,00	101,17	98,53	0,00	98,53	94,09	0,00	94,09	97,93 ± 2,92
THP	64,76	0,00	64,76	67,84	0,00	67,84	51,83	0,00	51,83	61,48 ± 6,93
KRM	91,20	7,14	98,33	95,29	8,80	104,10	62,70	11,28	73,98	92,14 ± 13,1
KRD	102,27	0,00	102,27	97,52	0,00	97,52	84,23	0,00	84,23	94,67 ± 7,63

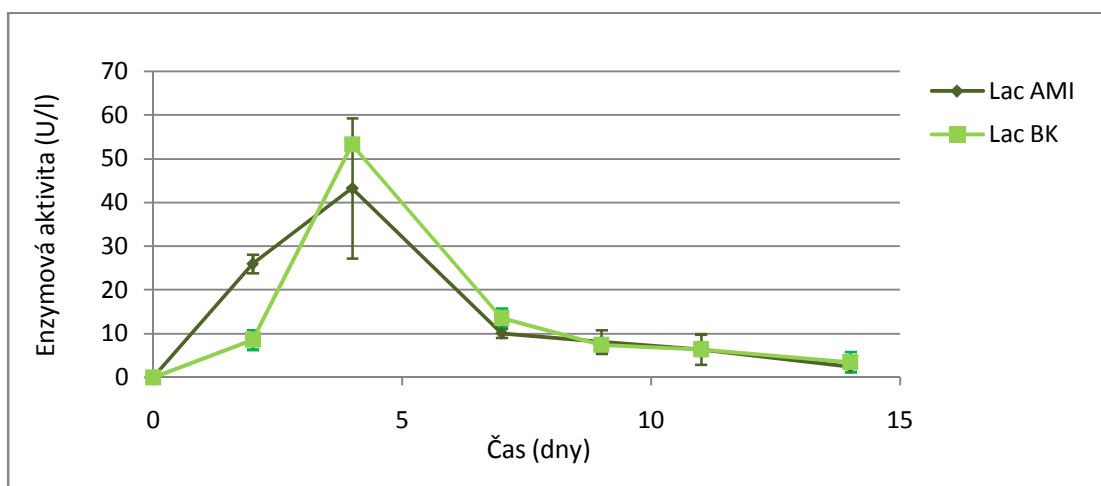
Tabulka 11: Výtěžnost Exp3 – okyselení vody před extrakcí na pH 2,5 a použití elučních činidel methanolu a methanolu s 2% roztokem kyseliny octové v poměru 70:30 (k.oct.).

	1. extrakce			2. extrakce			3. extrakce			Průměrná celková extrakční účinnost Exp3		
	MeOH	MeOH s 2% k. oct.	Celkem	MeOH	MeOH s 2% k. oct.	Celkem	MeOH	MeOH s 2% k. oct.	Celkem			
AMI	102,62	0,00	102,62	102,71	0,00	102,71	87,49	0,00	87,49	97,61	±	7,15
DSL	103,94	0,00	103,94	87,11	0,18	87,29	98,42	0,58	99,00	96,74	±	6,98
CPX	108,78	0,00	108,78	105,64	0,00	105,64	96,06	0,17	96,23	103,55	±	5,33
BUT	83,14	0,43	83,57	78,19	0,96	79,15	74,53	1,25	75,78	79,50	±	3,19
CLT	97,71	3,06	100,77	90,35	2,39	92,74	92,97	3,52	96,49	96,67	±	3,28
ISP	105,49	0,00	105,49	107,37	0,00	107,37	91,63	0,00	91,63	101,50	±	7,02
THP	68,98	0,63	69,61	65,16	0,98	66,14	52,96	1,43	54,39	63,38	±	6,51
KRM	101,27	0,89	102,16	93,14	0,52	93,66	99,42	0,96	100,38	98,74	±	3,66
KRD	60,97	0,00	60,97	85,23	0,00	85,23	79,10	0,00	79,10	75,10	±	10,3

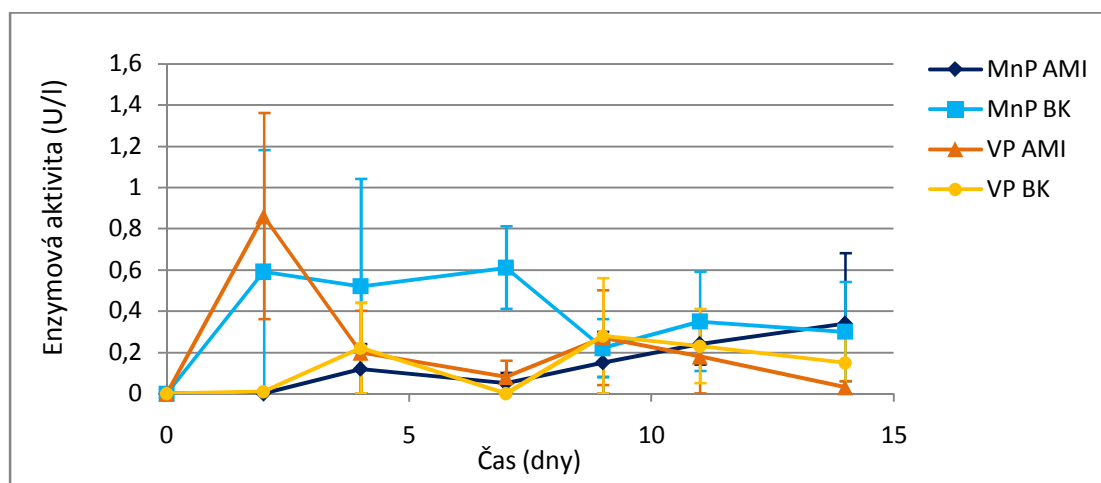
Tabulka 12: Výtěžnost Exp4 – okyselení vody na pH 2,5 použití elučního činidla methanolu s 0,6 % kyseliny octové (k. oct.)

	1. extrakce MeOH s k. oct.	2. extrakce MeOH s k. oct.	3. extrakce MeOH s k. oct.	Průměrná celková extrakční účinnost Exp4		
AMI	101,51	90,92	92,37	94,93	±	4,69
DSL	103,54	98,35	89,64	97,18	±	5,73
CPX	55,30	52,82	61,84	56,65	±	3,81
BUT	104,72	103,52	94,53	100,93	±	4,55
CLT	91,95	71,58	102,86	88,80	±	12,97
ISP	106,38	97,54	95,83	99,92	±	4,62
THP	63,40	53,42	68,25	61,69	±	6,17
KRM	86,79	82,56	89,37	86,24	±	2,81
KRD	36,09	30,34	50,40	38,94	±	8,43

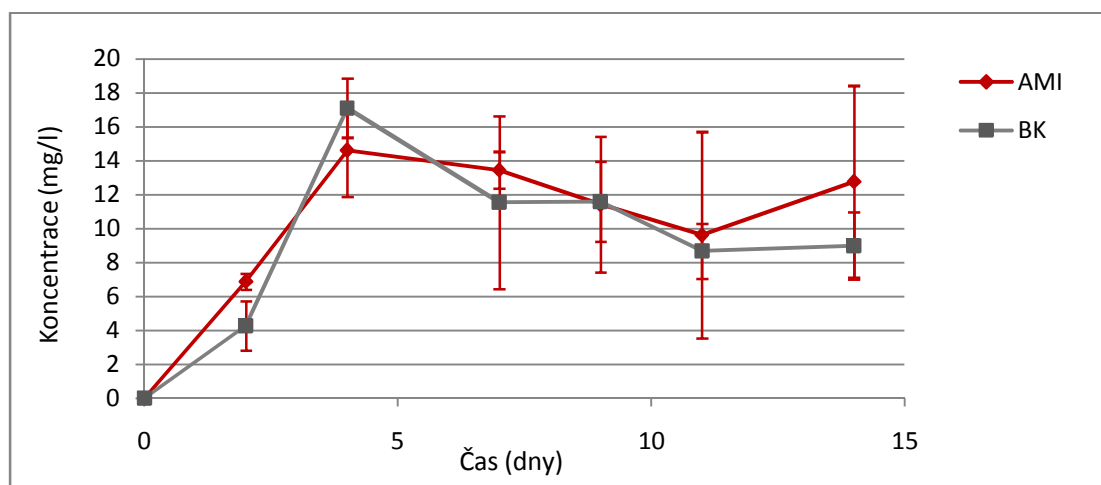
Graf 7: Enzymová aktivita Lac v degračním pokusu s AMI



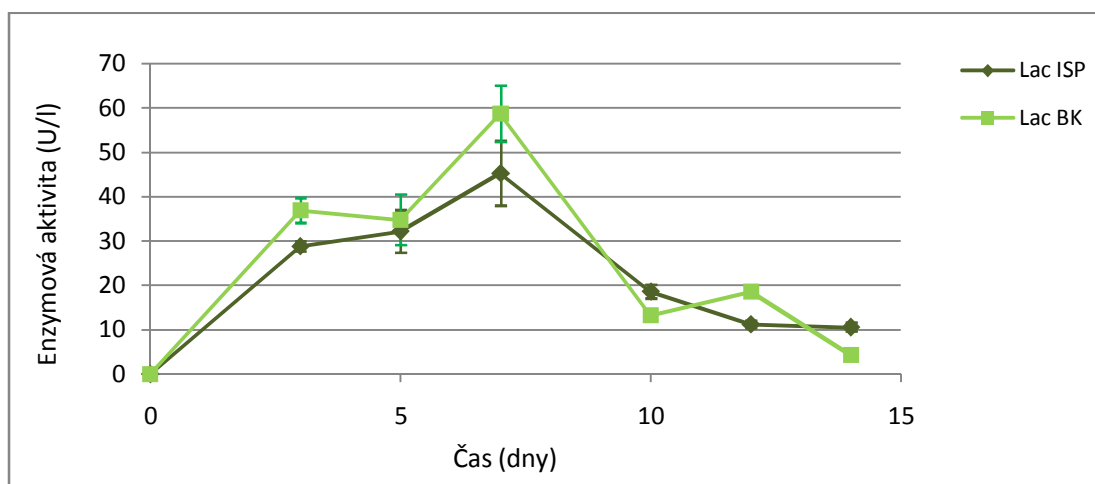
Graf 8: Enzymová aktivita MnP a VPv degračním pokusu s AMI



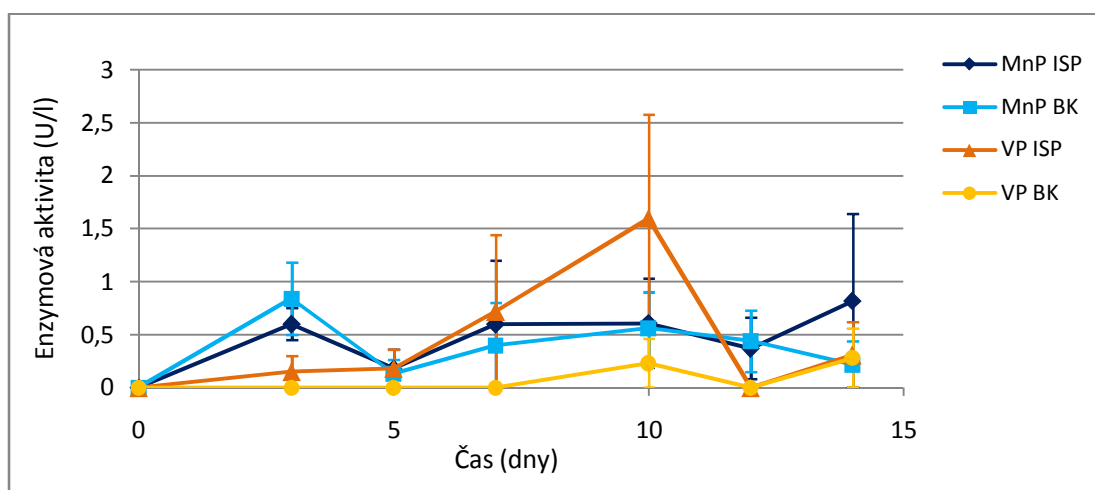
Graf 9: Množství proteinů degračním pokusu s AMI



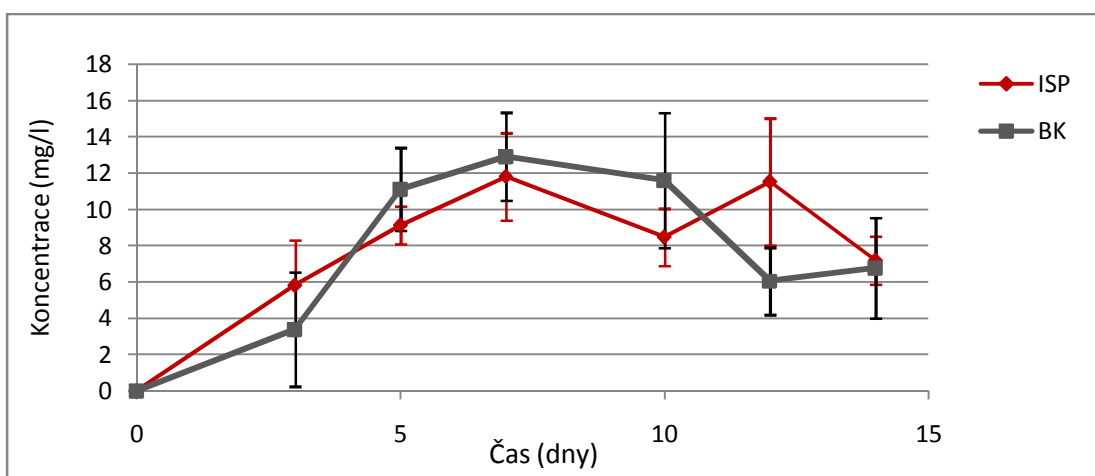
Graf 11: Enzymová aktivita Lac v degračním pokusu s ISP



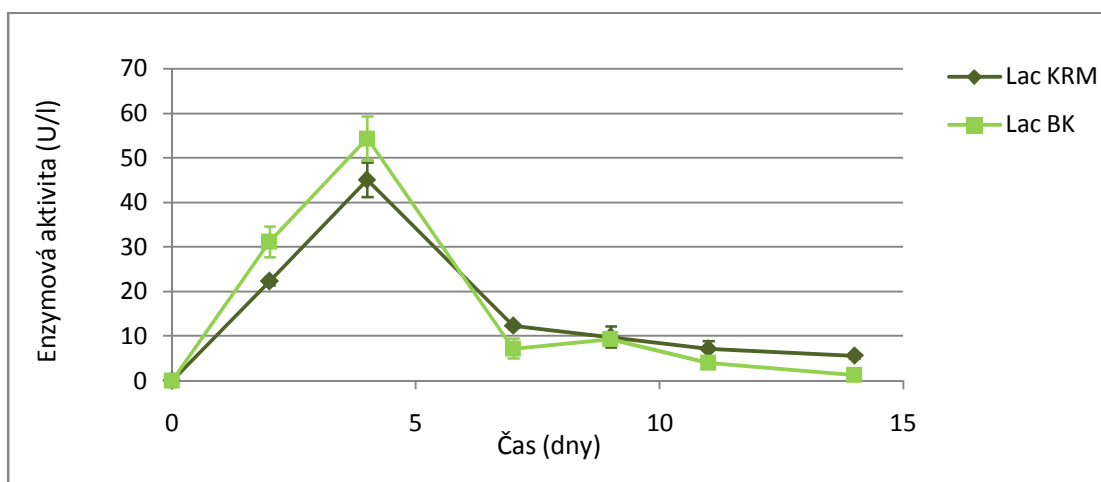
Graf 12: Enzymová aktivita MnP a VP v degračním pokusu s ISP



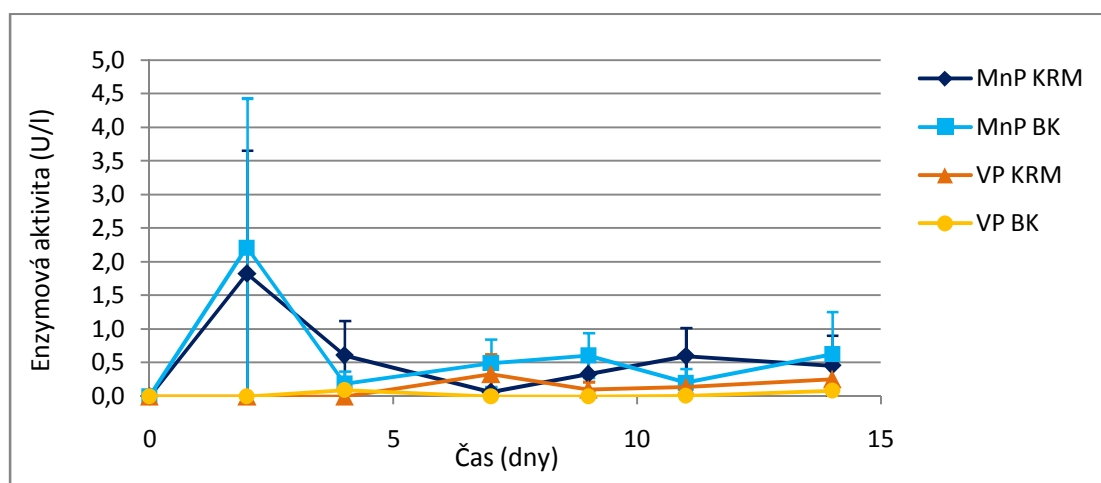
Graf 13: Množství proteinů v degračním pokusu s ISP



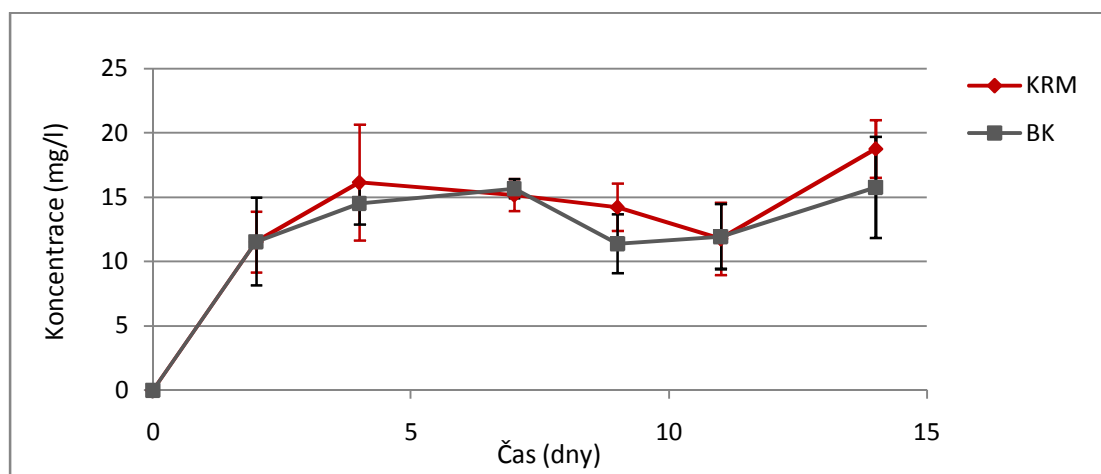
Graf 14: Enzymová aktivita Lac v degračním pokusu s KRM



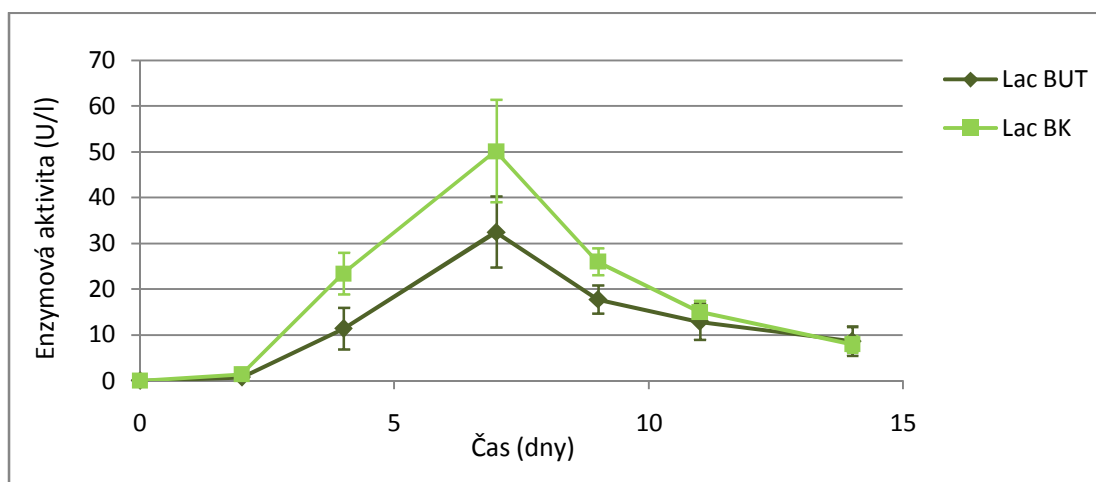
Graf 15: Enzymová aktivita MnP a VP v degračním pokusu s KRM



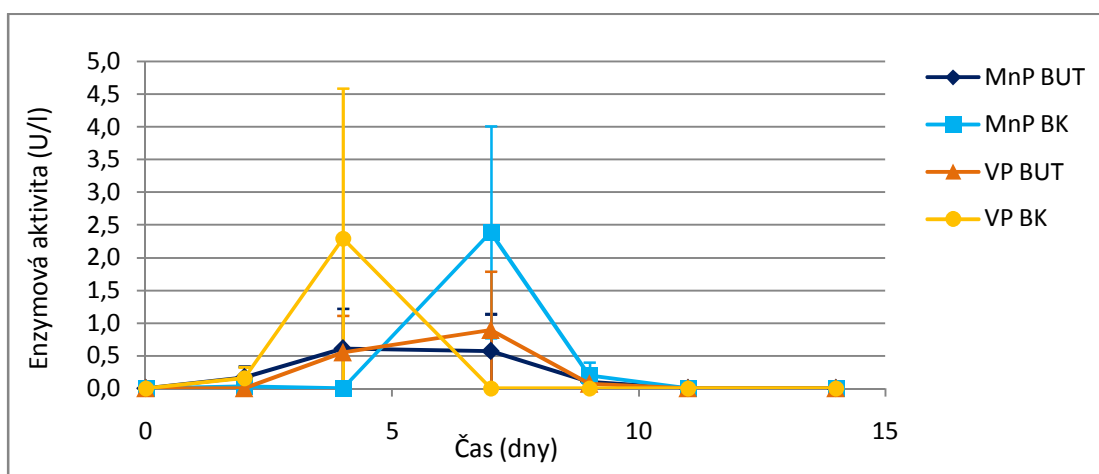
Graf 16: Množství proteinů v degračním pokusu s KRM



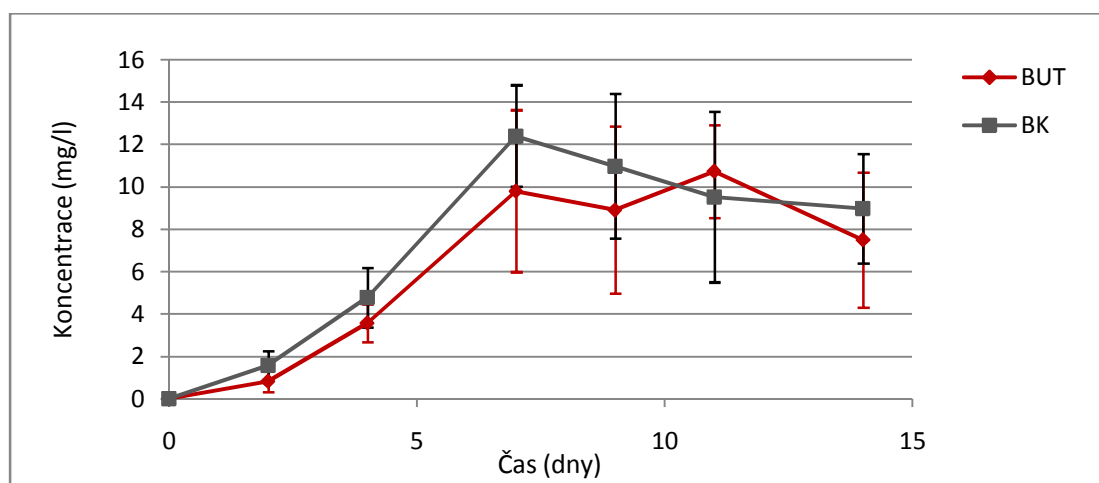
Graf 17: Enzymová aktivita Lac v degračním pokusu s BUT



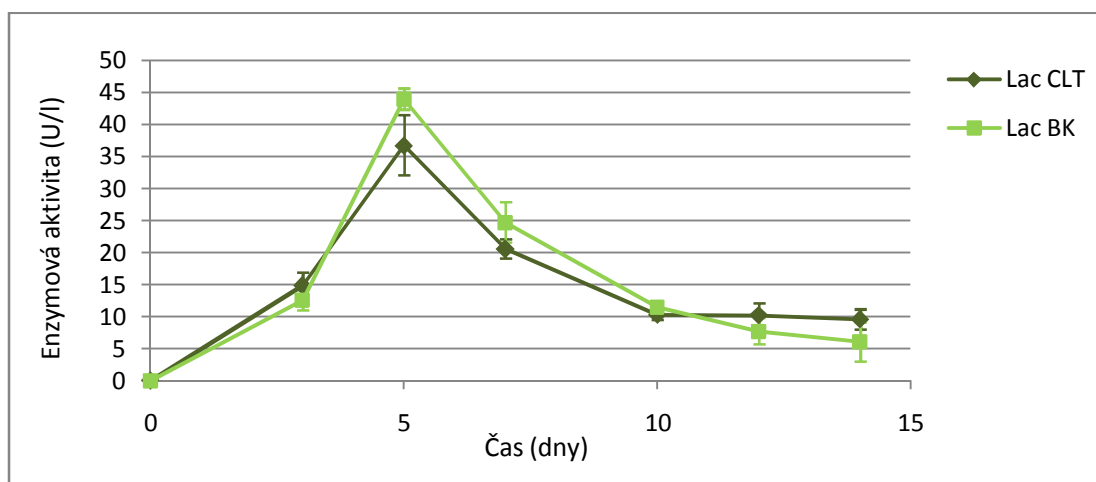
Graf 18: Enzymová aktivita MnP a VP v degračním pokusu s BUT



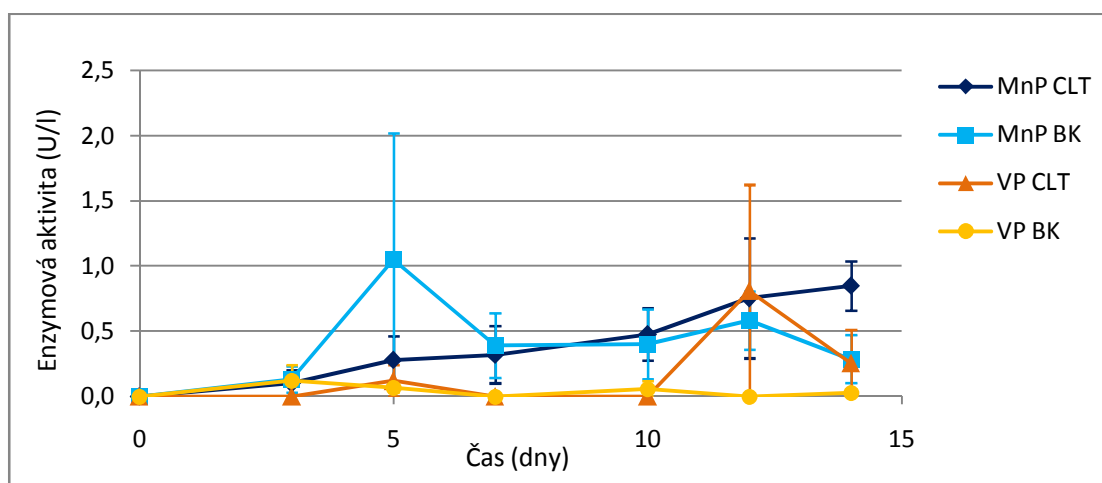
Graf 19: Množství proteinů v degračním pokusu s BUT



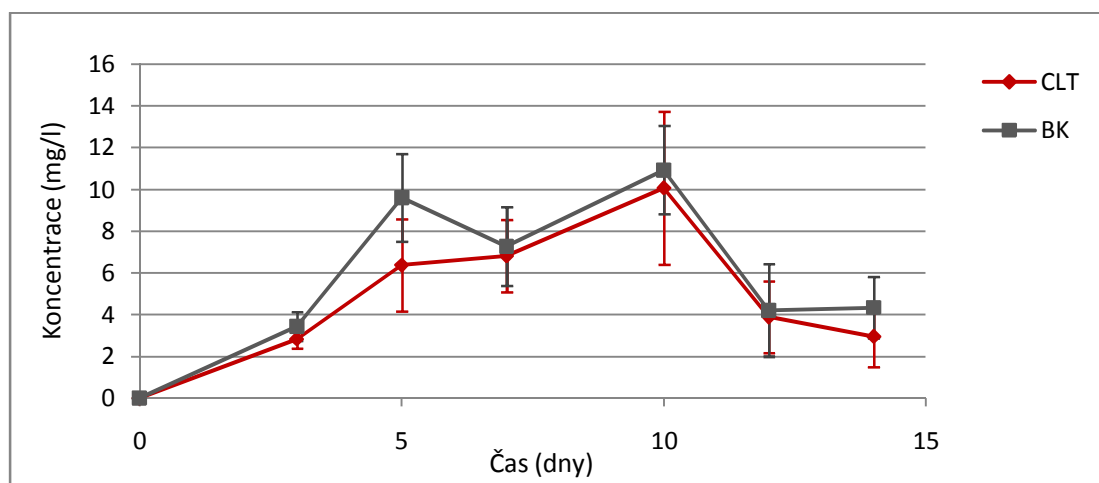
Graf 20: Enzymová aktivita Lac v degračním pokusu s CLT



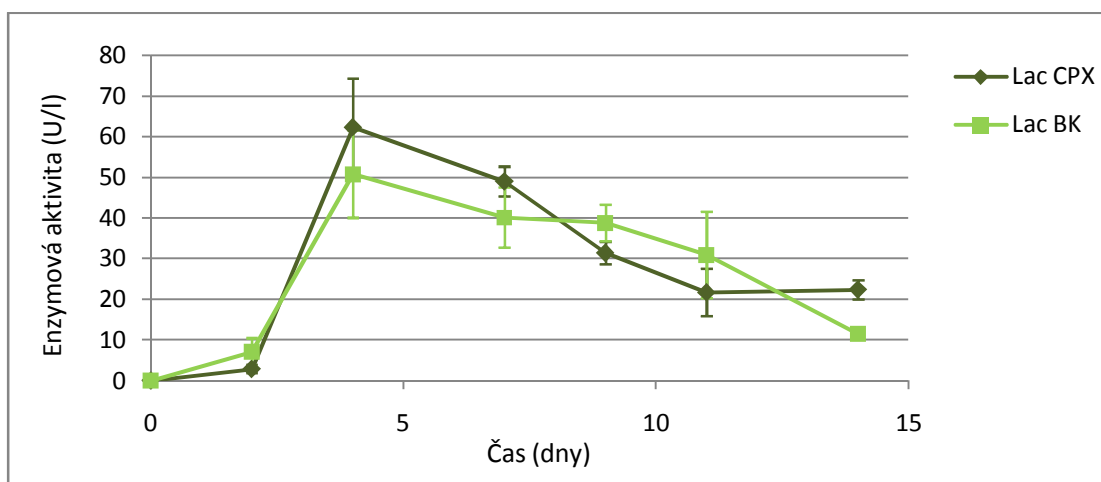
Graf 21: Enzymová aktivita MnP a VP v degračním pokusu s CLT



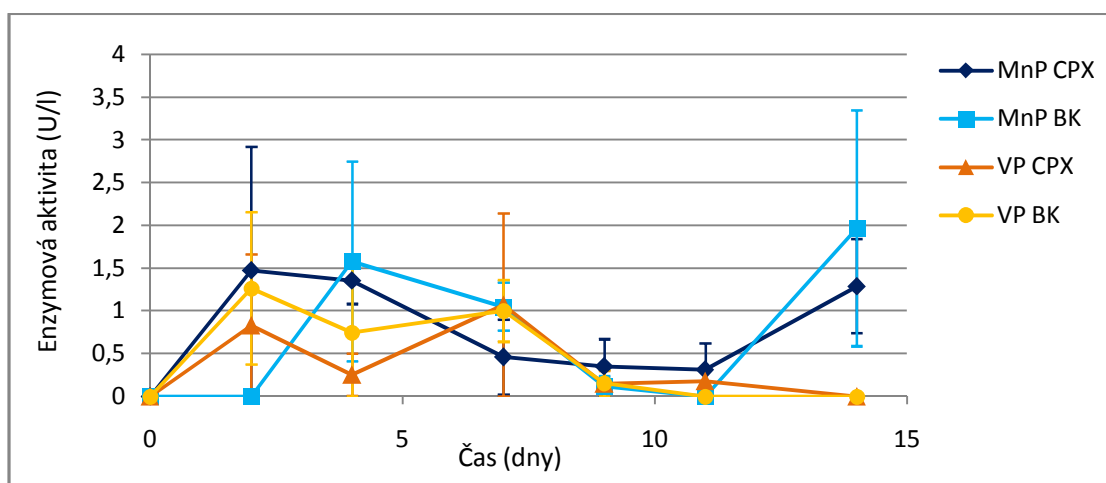
Graf 22: Množství proteinů v degračním pokusu s CLT



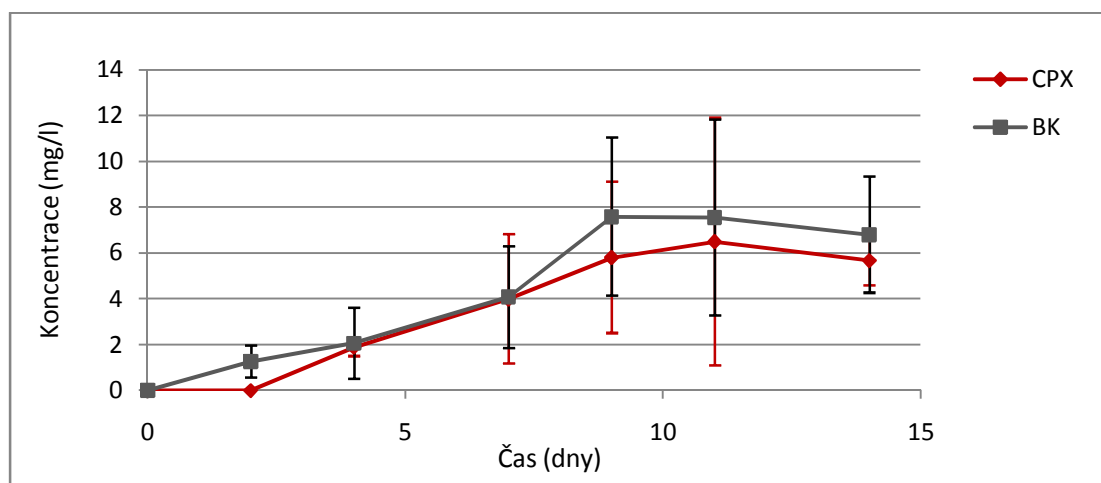
Graf 23: Enzymová aktivita Lac v degračním pokusu s CPX



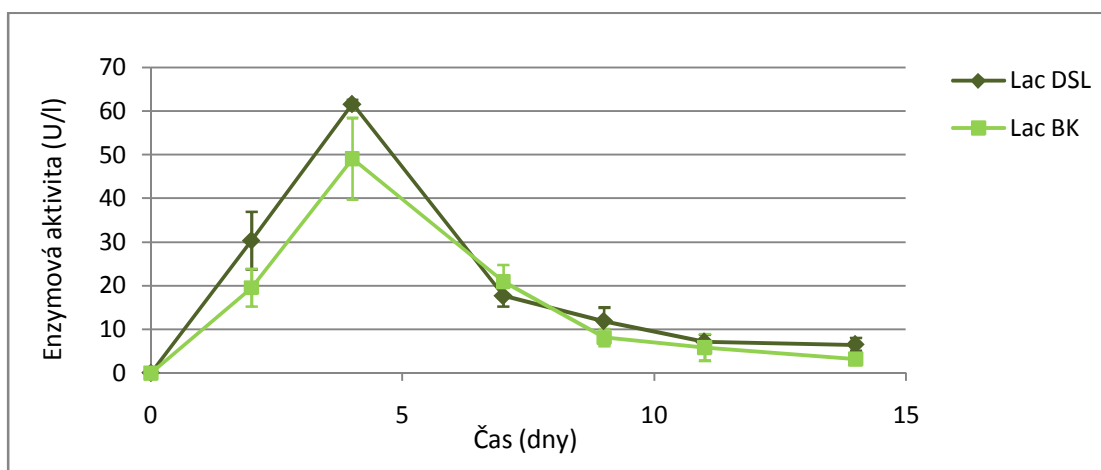
Graf 24: Enzymová aktivita MnP a VP v degračním pokusu s CPX



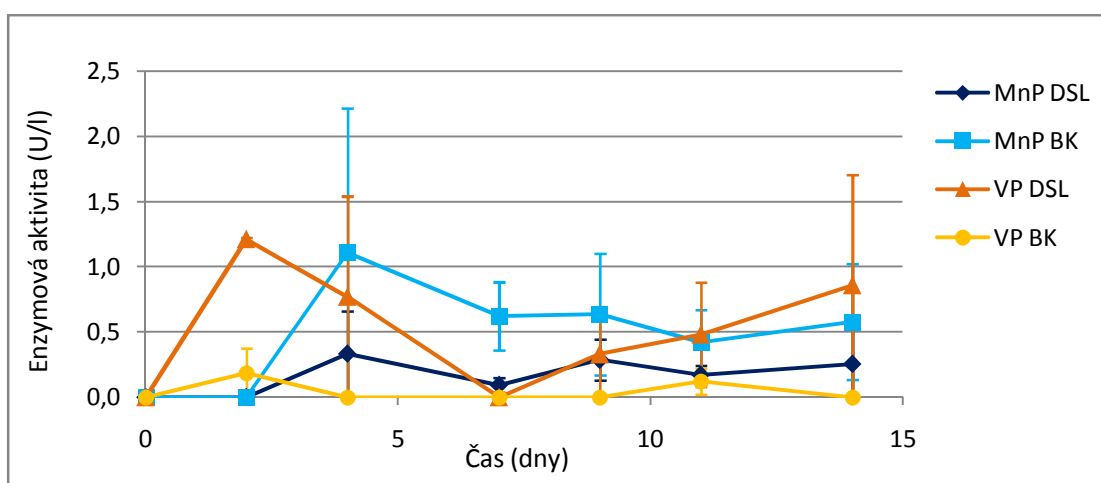
Graf 25: Množství proteinů v degračním pokusu s CPX



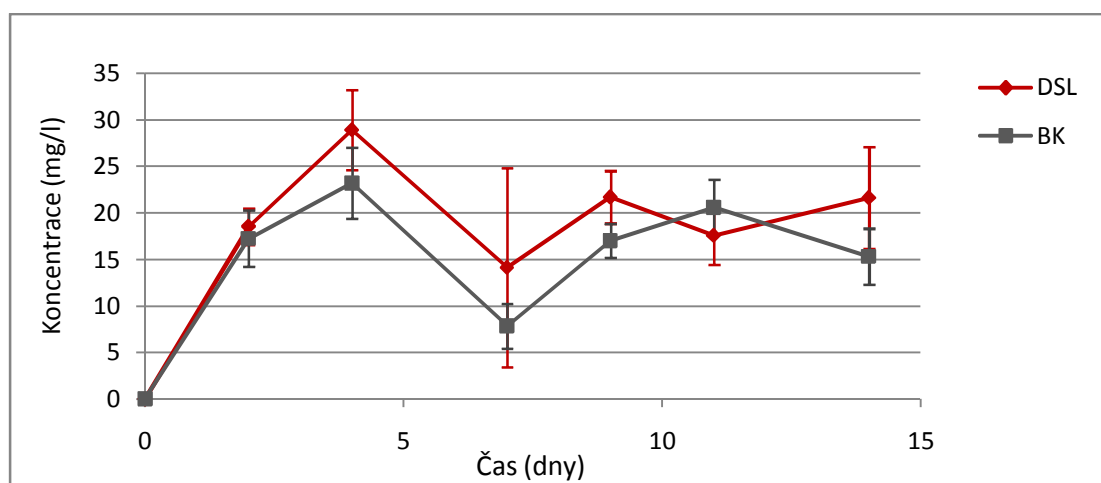
Graf 26: Enzymová aktivita Lac v degračním pokusu s DSL



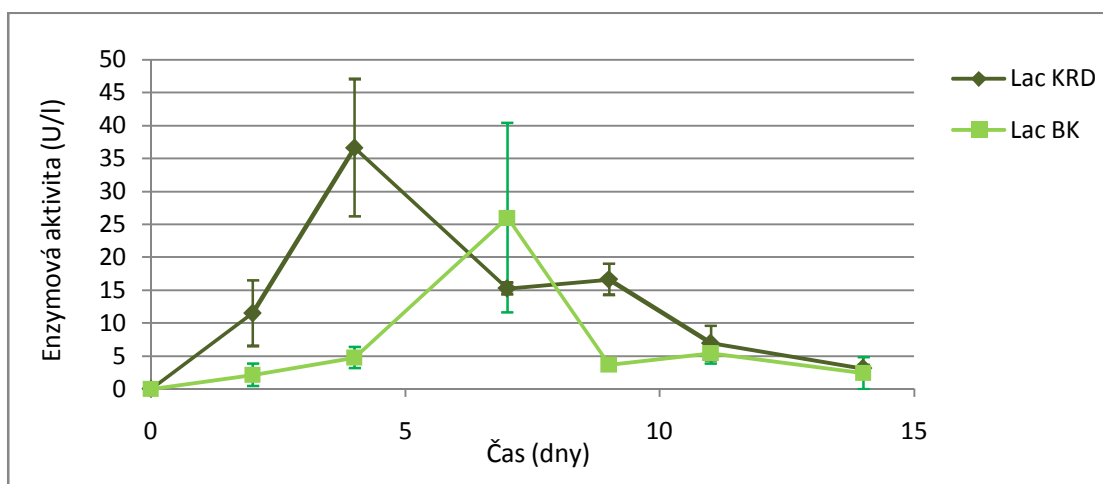
Graf 27: Enzymová aktivita MnP a VP v degračním pokusu s DSL



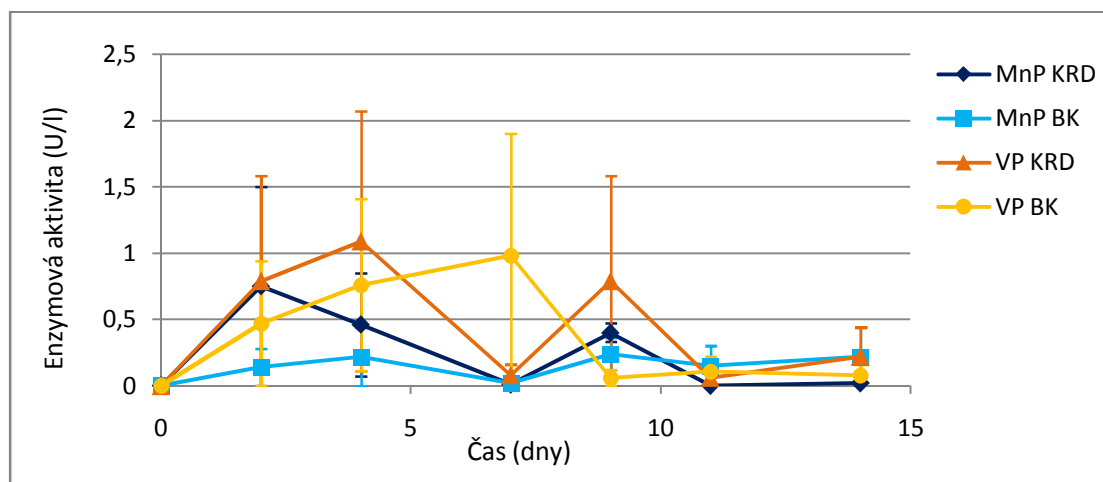
Graf 28: Množství proteinů v degračním pokusu s DSL



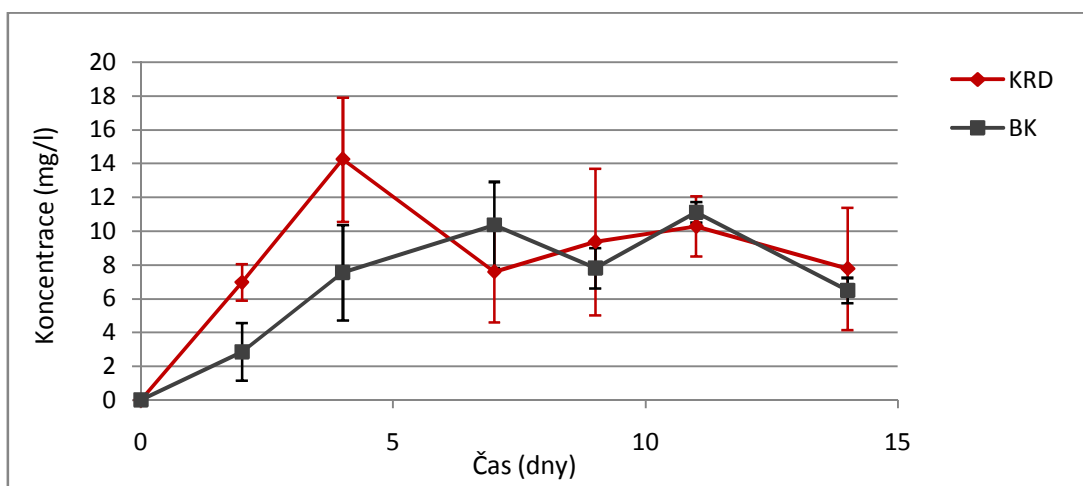
Graf 29: Enzymová aktivita Lac v degračním pokusu s KRD



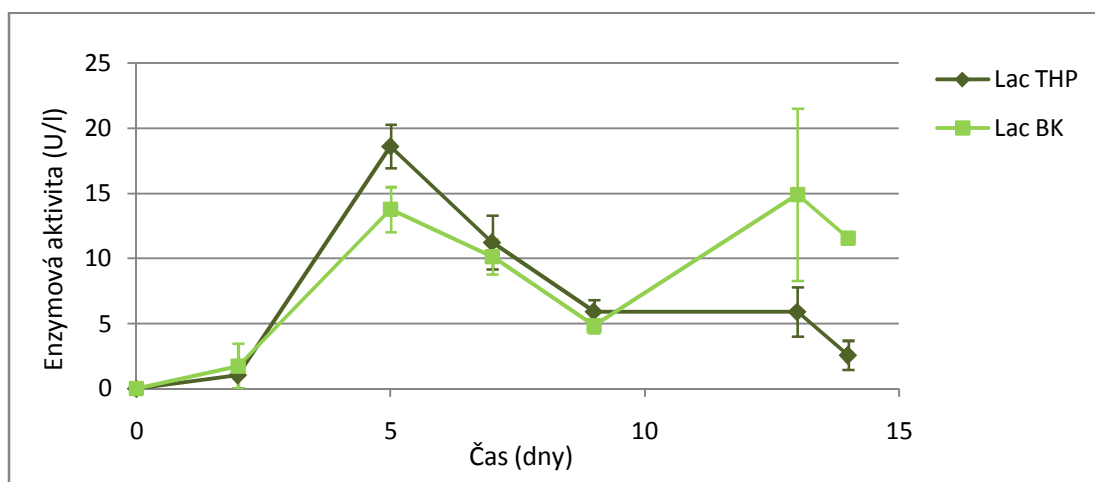
Graf 30: Enzymová aktivita MnP a VP v degračním pokusu s KRD



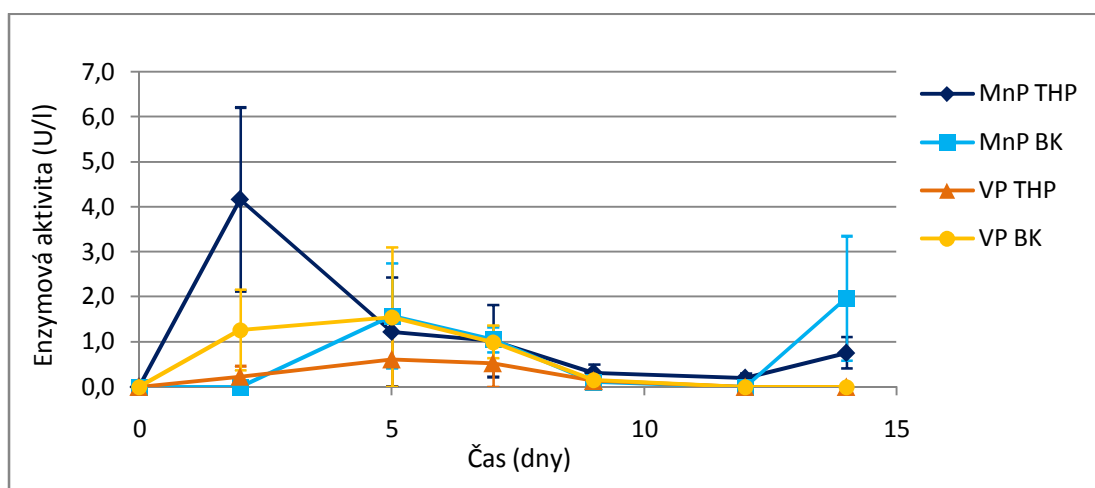
Graf 31: Množství proteinů v degračním pokusu s KRD



Graf 32: Enzymová aktivita Lac v degračním pokusu s THP



Graf 33: Enzymová aktivita MnP a VP v degračním pokusu s THP



Graf 34: Množství proteinů v degračním pokusu s THP

